CROMOZOMII ÎN CANCER

C. D. OLINICI

Dr. CORNELIU D. OLINICI
INSTITUTUL ONCOLOGIC CLUJ-NAPOCA

CROMOZOMII ÎN CANCER

EDITURA MEDICALĂ
BUCUREȘTI 1978

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

1. ISTORIC 9

2. CARIOTIPUL UMAN NORMAL. ANOMALIILE CROMOZOMIALE ȘI ORIGINEA LOR 12

2.1. Introducere 12
2.2. Ciclul celular și mitoza 12
2.3. Aspectul general al cromozomilor metafazici 14
2.4. Cariotipul uman 16
2.5. Autoradiografia cromozomilor umani 21
2.6. Heterocromatina constitutivă și facultativă. Benzile C 23
2.7. Diferențierea longitudinală a cromozomilor umani 26
2.8. Anomaliile cromozominale și originea lor 29
2.9. Cromatina sexuală 39
2.10. Nomenclatura utilizată în citogenetică 43
2.11. Determinarea citochimică a cantității de ADN din nuclei 48

3. CICLUL CELULAR ÎN TUMORI 53

3.1. Introducere 53
3.2. Ciclul celular în țesuturile normale 53
3.3. Cinetica creșterii tumorale 60
3.4. Cinetica tumorilor umane 68
3.5. Chimioterapia, radioterapia și ciclul celular 70

4. MODIFICĂRI CROMOZOMIALE EREDITARE ȘI PREDISPOZIȚIA PENTRU CANCER 81

4.1. Introducere 81
4.2. Anemia Fanconi 81
4.3. Sindromul Bloom 84
4.4. Ataxia-teleangiectazia (sindromul Louis-Barr) 84
4.5. Sindroame genetice caracterizate prin aneuploidie 85

5. SINDROAMELE MIELOPROLIFERATIVE 89

5.1. Introducere 89
5.2. Policitemia vera 89
5.3. Eritroleucemia 91
5.4. Metaplazia mieloidă 91
5.5. Trombocitemia idiopatică 94
5.6. Sindroame mieloproliferative atipice 94

6. INSUFICIENȚELE MEDULARE 98

Scanned with OKEN Scanner

7. MODIFICĂRI CROMOZOMIALE ÎN LEUCEMII 103
7.1. Leucemia granulocitară cronică 103
7.2. Leucemia limfocitară cronică 112
7.3. Leucemiile acute 113

8. DISPROTEINEMIILE 125
8.1. Introducere 125
8.2. Macroglobulinemia Waldenström 125
8.3. Mielomul multiplu 127
8.4. Paraproteinemiile simptomatice 128

9. LIMFOAMELE MALIGNE 131
9.1. Introducere 131
9.2. Limfomul giganto-folicular 131
9.3. Limfosarcoame 132
9.4. Reticulosarcoame 134
9.5. Boala Hodgkin 136
9.6. Limfoame de origine extraganglionară (micoza fungoidă, sindromul Sézary) 139
9.7. Limfomul Burkitt 139

10. MODIFICĂRILE CROMOZOMIALE DIN TUMORILE UMANE MALIGNE 144
10.1. Introducere 144
10.2. Aparatul respirator 144
10.3. Aparatul digestiv 146
10.4. Aparatul genital masculin 149
10.5. Aparatul genital feminin 150
10.6. Aparatul urinar 163
10.7. Sistemul nervos 164
10.8. Glandele endocrine 167
10.9. Tumori oculare 167
10.10. Pielea 168
10.11. Alte tumori 169

11. STUDIUL NUCLEILOR INTERFAZICI ÎN TUMORILE MALIGNE 178
11.1. Introducere 178
11.2. Cromatina sexuală în tumorile maligne 178
11.3. Corpusculul Y în tumorile maligne 182

12. HIBRIDAREA CELULARĂ 185
12.1. Introducere 185
12.2. Procedee de obținere a hibrizilor 185
12.3. Mecanismul fuziunii celulare 186
12.4. Generalitatea fenomenului de hibridare 187
12.5. Constituția citogenetică a celulelor hibride. Aplicații la studiul geneticii umane 187
12.6. Aportul hibridării celulare la studiul diferențierii 188
12.7. Aplicații ale hibridării celulare la studiul cancerului 189

13. CROMOZOMII ȘI CARCINOGENEZA CHIMICĂ 200
13.1. Introducere 200
13.2. Aspectele citogenetice ale tumorilor induse chimic 204
13.3. Modificările cromozomiale și transformarea chimică *in vitro* 209

Scanned with OKEN Scanner

14. CROMOZOMII ȘI CARCINOGENEZA VIRUSALĂ 213
14.1. Introducere 213
14.2. Generalități asupra carcinogenezei virusale 214
14.3. Interacțiunea dintre virusuri și celule 215
14.4. Mecanismele posibile ale carcinogenezei virusale 217
14.5. Tipuri de modificări cromozomiale produse de virusuri 219
14.6. Efectele virusurilor ADN 220
14.7. Efectele virusurilor ARN 226

15. SEMNIFICAȚIA MODIFICĂRILOR CROMOZOMIALE ÎN CANCER 233
15.1. Introducere 233
15.2. Analiza globală a modificărilor cromozomiale din tumori 233
15.3. Originea clonală a tumorilor 238
15.4. Evoluția clonală în tumori 240
15.5. Constituția citogenetică a tumorilor primitive și a metastazelor lor 242
15.6. Valoarea diagnostică și prognostică a examinărilor cromozomiale 244
15.7. Cromozomii și inițierea malignității 246

Scanned with OKEN Scanner

Cuvînt înainte

Lucrarea de față, pe care o recomand călduros cititorului, reprezintă încununarea firească a unei activități susținute pe care doctorul Olinici a depus-o de peste zece ani, în calitatea sa de șef al Laboratorului de Genetică al Institutului Oncologic Cluj-Napoca. Specializat în renumitul centru american de cercetări citogenetice și citologice al Institutului Național de Cancer din Bethesda, de sub conducerea profesorului J. A. DiPaolo, doctorul Olinici s-a remarcat prin studii de genetică clinică referitoare la valoarea practică a evidențierii anomaliilor cromozomiale în stările precanceroase și la semnificația și importanța prognostică a determinării incidenței cromatinei sexuale în tumorile mamare. În același timp, autorul a întreprins studii valoroase de citogenetică experimentală, contribuind prin numeroase articole publicate în prestigioase reviste din țară și din străinătate la elucidarea unor probleme majore ale cercetării fundamentale oncologice. Amintesc în acest sens, studiile asupra rolului cromozomilor în carcinogeneza chimică, investigarea comparativă a populațiilor celulare din tumorile primitive și din metastazele lor, cercetările asupra tumorilor heterografate etc.

Introducerea recentă a tehnicilor de bandare a cromozomilor a lărgit apreciabil posibilitățile de investigație în domeniul citogeneticii tumorale și a arătat că modificarea echilibrului cromozomial, determinată de afectarea unor cromozomi specifici, poate interveni în geneza transformării maligne a celulelor. Chiar dacă rolul modificărilor cromozomiale în inițierea stării de malignitate nu a fost încă demonstrat suficient de convingător, este evidentă existența unei relații între tabloul cromozomial al tumorilor și caracteristicile lor biologice (antigenicitate, capacitate metastazantă, rezistență la chimioterapie etc.). Pe de altă parte, tehnicile de cito-

Scanned with OKEN Scanner

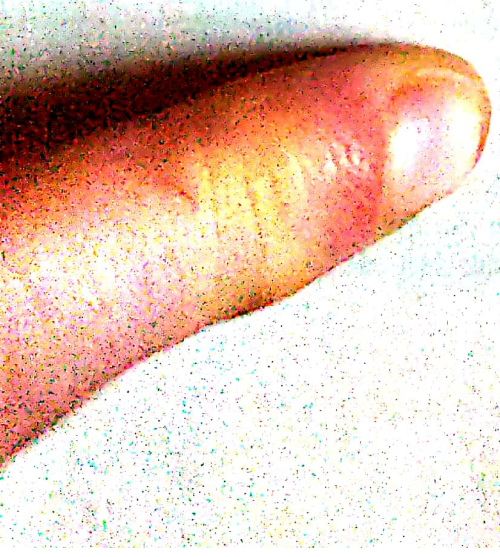
genetică încep să fie aplicate în clinică, în diagnosticul afecțiunilor hematologice sau al exsudatelor, oferind o perspectivă nouă noțiunii de malignitate, pe care o relevă într-un stadiu precoce, prehistologic.

Existența unui număr imens de publicații care — ca în orice domeniu aflat în plină efervescență — aduc adesea date contradictorii, face extrem de dificilă o prezentare unitară, ceea ce explică numărul foarte redus de monografii existente pe plan mondial. Lucrarea pe care o prefațăm realizează o prezentare competentă, bazată pe un număr de peste 1 500 de referințe bibliografice, a celor mai noi date referitoare la modificările cromozomiale din tumorile umane și experimentale. Înțelegerea materialului este facilitată de prezentarea, în partea introductivă, a elementelor teoretice fundamentale. Capitole speciale sînt dedicate unor probleme extrem de moderne și fascinante ca hibridarea celulară, ciclul celular, rolul cromozomilor în carcinogeneza chimică și virusală. În capitolul final sînt discutate principalele teorii referitoare la semnificația modificărilor cromozomiale în inițierea și progresiunea neoplaziilor.

Sîntem convinși că lucrarea, care se încadrează într-un ciclu de monografii pe care Institutul Oncologic Cluj-Napoca le pune a dispoziția publicului medical interesat în cunoașterea sau aprofundarea unor probleme moderne ale etiopatogeniei și clinicii cancerului, va fi consultată nu numai cu folos, ci și cu plăcere.

PROF. DR. DOC. I. CHIRICUȚĂ

Cluj-Napoca, 1977



Scanned with OKEN Scanner

1. ISTORIC

Citogenetica umană modernă începe abia în anul 1956, cînd Tjio şi Levan (11) au stabilit că numărul corect, diploid de cromozomi al speciei umane este de 46 şi au descris principalele caractere morfologice ale cromozomilor umani. Hauschka (6) putea de aceea să afirme că „*Homo sapiens* a cunoscut nucleul atomic înainte de a cunoaşte numărul de cromozomi din nucleii propriului său corp". Această întîrziere a fost determinată de dificultăţi tehnice considerabile. Singurul material disponibil era reprezentat de secţiunile histologice tăiate la o grosime care să permită păstrarea intactă a garniturii de cromozomi dintr-o celulă (5–7,5 microni). Cromozomii erau aglomeraţi, iar utilizarea fotografiei era imposibilă din cauza suprapunerilor multiple. În aceste condiţii, singura metodă de studiu a fost reprezentată de examenul microscopic în diferite planuri focale al preparatelor, urmat de redarea grafică prin desene a imaginilor.

Prima descriere a diviziunii celulare îi aparţine lui Virchow (12), care a arătat că celulele nu iau niciodată naştere *de novo*, ci derivă din alte celule. Flemming (2) a descris în 1882 diviziunile celulare din epiteliul cornean al omului şi a introdus termenul de „mitoză". Prima încercare de a determina numărul de cromozomi ai omului a fost făcută de Hansemann (5) care, în trei celule normale, a numărat 18, 24 şi „peste 40 de cromozomi". În anul 1912, von Winiwarter (13) a conchis că numărul de cromozomi al speciei umane este de 48 la femei şi de 47 la bărbaţi, mecanismul de determinare a sexului constînd în doi cromozomi X la femeie şi un cromozom X la bărbat. Deşi inexacte, aceste cifre sînt surprinzător de apropiate de realitate, dacă ţinem seama de condiţiile în care au fost obţinute. Rîndurile lui von Winiwarter ne-o mărturisesc: „Am pierdut un timp enorm repetînd numărători obositoare şi, recunosc, plictisitoare. Am întîlnit însă, pe de altă parte, fapte noi pe care le cred importante".

Următoarea etapă importantă a fost reprezentată de cercetările lui Painter (8,9) care, în anul 1921, a observat prezenţa unui cromozom mic Y la mai mulţi bărbaţi. Coroborînd rezultatele sale cu

Scanned with OKEN Scanner

datele lui von Winiwarter, Painter a conchis că numărul diploid de cromozomi al speciei umane este de 48, cromozomii sexuali fiind XX la femeie și XY la bărbat.

În anul 1956, utilizînd culturi de fibroblaști derivați din plămînii unor feți umani avortați, Tjio și Levan (11) au observat în mod constant cifre de 46 de cromozomi. Realitatea acestor determinări a fost în curînd confirmată de Ford și Hamerton (3) care, pe un material provenit din biopsii testiculare, au numărat 46 de cromozomi în metafazele spermatogoniilor și 23 de bivalenți în spermatocitele primare aflate în metafaza I.

Atît aceste cercetări, cît și cele care au urmat, au beneficiat de o serie de îmbunătățiri tehnice (7), dintre care cele mai importante sînt:

a) Utilizarea culturilor de țesuturi. Celulele cultivate *in vitro* prezintă un număr mai mare de mitoze, iar calitatea lor este superioară, deoarece celulele aflate în suspensie sau crescînd în monostrat sînt mai accesibile acțiunii agenților hipotonizanți și fixatori.

b) Pretratarea celulelor cu colchicină. Colchicina și produsul sintetic similar, colcemidul, opresc în mod specific celulele în metafază, interferînd cu formarea fusului. De asemenea, colchicina contractă cromozomii, definind mai bine structura lor morfologică.

c) Utilizarea soluțiilor hipotone, care determină tumefierea celulelor și permite separarea cromozomilor, dispuși într-un spațiu mai mare.

d) Strivirea celulelor sau tehnicile de uscare la aer determină dispoziția cromozomilor — separați datorită tratamentului hipotonic, dar aflați încă într-o celulă de formă sferică — într-un singur plan focal și permite astfel caracterizarea morfologiei cromozomilor.

Cercetările referitoare la comportamentul cromozomilor în cancer au fost determinate de recunoașterea rolului lor fundamental atît în condiționarea structurii, funcției și specificității celulelor, cît și în transmiterea materialului ereditar celulelor fiice. Prima lucrare de sinteză în acest domeniu i se datorește lui Theodor Boveri (1) și a fost publicată în anul 1914. Conform teoriei lui Boveri, celulele maligne se caracterizează printr-o constituție cromatică anormală. Aceasta este, uneori, consecința unor mitoze anormale, multipolare, dar „. . . modul în care se produce nu are nici o semnificație. Orice proces care determină această constituție cromatinică va reprezenta originea unei tumori maligne".

Interesul pentru studiul cromozomilor în celulele canceroase a fost reluat după publicarea lucrărilor fundamentale ale lui Ford și Hamerton (3) și Tjio și Levan (11). În anul 1964, numărul mare al publicațiilor referitoare la cromozomii celulelor maligne justifica intro-

Scanned with OKEN Scanner

ducerea termenului de „oncocitogenetică", pentru a desemna un nou domeniu de cercetare, relativ independent.

Relația dintre modificările cromozomiale și cancer nu este încă clarificată. Rolul primordial al aberațiilor cromozomiale în producerea cancerului nu a fost încă dovedit, deși această posibilitate este discutată pentru unele tumori. Problema relației cauzale dintre defectele cromozomiale și apariția tumorilor maligne ar trece însă pe un plan secundar, dacă caracteristicile unei tumori (capacitate proliferativă, stabilitate și flexibilitate) induse de un agent fizic, chimic sau virusal ar fi dependente de constituția lor cromozomială (14). Dealtfel, „una din frumusețile teoriei originii cromozomiale a cancerului este faptul că ea nu exclude celelalte teorii. Oncogeneza chimică, oncogeneza virusală și chiar imunooncogeneza pot fi, toate, puse de acord cu teoria cromozomială" (10).

BIBLIOGRAFIE

1. BOVERI T. — Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren, Ed. Gustav Fischer, Jena, 1914.
2. FLEMMING W. — *Arch. Mikr. Anat.*, 1882, *20*, 1.
3. FORD C.E., HAMERTON J.L. — *Nature (Lond.)*, 1956, *178*, 1 010.
4. FORTEZA BOVER G., BAGUENA CANDELA R., TORTAJADA MARTINEZ M. — Comunicare la Symposium sobre mitosis e inhibidores en la quimioterapia oncologica (Sandoz), Barcelona, 1964, în volum, p. 3.
5. HANSEMANN D. — *Wirchows Arch. path. Anat.*, 1891, *123*, 356.
6. HAUSCHKA T. S. — *Cancer Res.*, 1961, *21*, 957.
7. HSU T. C. — In: Human chromosome methodology (sub red. J. J. Yunis), Academic Press, New York — Londra, 1965, XIII.
8. PAINTER T. S. — *Science*, 1921, *53*, 503.
9. PAINTER T. S. — *Amer. Natural.*, 1924, *58*, 506.
10. SHAW M. W., CHEN T. R. — in: Chromosomes and cancer (sub red. J. German), John Wiley and Sons, New York, — Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 135.
11. TJIO J. H., LEVAN A. — *Hereditas*, 1956, *42*, 1.
12. VIRCHOW R. — Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologisch und patologische Gewebelehre, Berlin, 1858.
13. VON WINIWARTER H. — *Arch. Biol. (Liège)*, 1912, *27*, 97.
14. WOLF U. — in: Chromosomes and cancer (sub red. J. German), John Wiley and Sons, New York-Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 3.

Scanned with OKEN Scanner

2. CARIOTIPUL UMAN NORMAL, ANOMALIILE CROMOZOMIALE ȘI ORIGINEA LOR

2.1. Introducere

Cromozomii sînt structuri filiforme vizibile în decursul mitozei și al meiozei. În timpul mitozei, care asigură creșterea și repararea normală a țesuturilor somatice, cromozomii se divid și se repartizează în mod egal în cele două celule fiice. Meioza este o formă specializată de diviziune a celulelor reproducătoare, care are drept rezultat înjumătățirea numărului diploid de cromozomi la un număr haploid. Prin fuzionarea a doi gameți haploizi în timpul fecundației se formează un zigot diploid; acesta, prin diviziuni succesive, va da naștere celor 10^{14} celule care alcătuiesc organismul uman.

2.2. Ciclul celular și mitoza

Viața celulelor se desfășoară în două etape principale: interfaza și mitoza.

2.2.1. Interfaza

Aspectul celulelor interfazice este extrem de variabil, în funcție atît de tipul de celulă, cît și de starea ei funcțională. Singurele structuri vizibile în nucleii interfazici cu ajutorul metodelor uzuale de colorație sînt nucleolii și cromatina. Nucleolii sînt formațiuni rotunde, cu aspect fin fibrilar, alcătuiți în special din acid ribonucleic. Cromatina formează o rețea în ochiurile căreia se observă granule mai intens colorate (cromocentrii). O parte din cromatină se dispune în jurul nucleolilor, alcătuind cromatina asociată nucleolilor; altă parte se asociază cu foița internă a învelișului nuclear. În celulele provenite de la femei se observă un cromocentru foarte distinct, care alcătuiește cromatina sexuală.

Scanned with OKEN Scanner

Rețeaua cromatinică și cromocentrii reprezintă forma sub care sînt vizibili cromozomii, a căror continuitate nu este întreruptă în interfază, dar care își modifică starea fizică și afinitățile tinctoriale. Cromozomii interfazici reprezintă matricea pe care este sintetizat ARN-ul mesager care direcționează ordinea de ansamblare a aminoacizilor. Tot în timpul interfazei are loc duplicarea ADN-ului în vederea mitozei. Etapa din interfază cînd se produce dublarea cantității de ADN cromozomial a fost denumită perioadă S. Între începutul perioadei S și sfîrșitul diviziunii celulare anterioare se interpune perioada G1. Perioada dintre sfîrșitul fazei S și începutul următoarei diviziuni celulare a fost denumită G2. Atît în G1, cît și în G2, sinteza de ADN este suspendată (fig. 1).

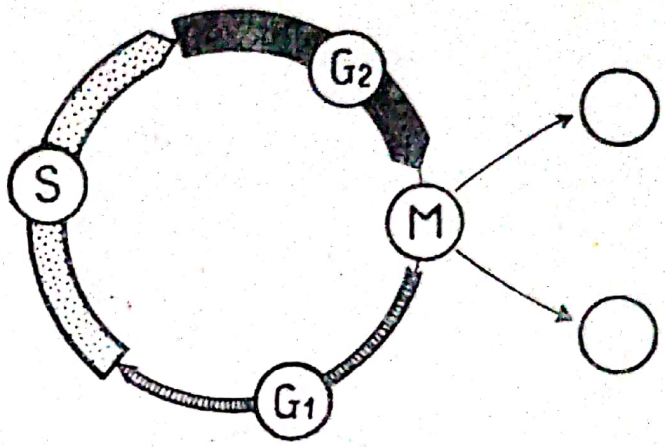


Fig. 1 — Fazele ciclului celular (explicația în text).

2.2.2. Mitoza

Mitoza se desfășoară în patru etape succesive: profaza, metafaza, anafaza și telofaza (fig. 2).

a) Profaza este prima etapă a diviziunii celulare. În decursul profazei, nucleul își mărește dimensiunile. Cromozomii devin vizibili sub forma unor filamente fine care, pe măsură ce profaza avansează, se scurtează și se îngroașă, apărînd mai intens colorabile. În profază, cromozomii sînt deja dedublați și alcătuiți din două cromatide unite la nivelul centromerului. Dimensiunile nucleolilor diminuează și ei sînt în cele din urmă rezorbiți. În același timp, în citoplasma din vecinătatea nucleului are loc diviziunea centrozomului, iar centriolii încep să migreze spre polii celulei.

b) Începutul *metafazei* este marcat de dispariția membranei nucleare, astfel încît conținutul nucleului se amestecă cu citoplasma. Centriolii sînt dispuși la polii opuși ai celulei, iar microtubulii se organizează, alcătuind fusul mitotic. Cromozomii se dispun în planul ecuatorial al celulei, fiind atașați de fibrele fusului la nivelul centromerului. În cursul metafazei, cromozomii sînt contractați și au caractere morfologice foarte distincte.

c) În timpul *anafazei*, centromerul fiecărui cromozom se divide în sens longitudinal, iar cromatidele își încep deplasarea de-a

Scanned with OKEN Scanner

lungul fibrelor spre polii apuşi ai celulei. Momentul în care cromatidele ajung la polii celulei marchează începutul telofazei.

d) În *telofază*, citoplasma se clivează, rezultînd două celule fiice. Cromozomii devin tot mai elongaţi şi îşi pierd structura vizibilă. Membrana nucleară se reformează, reapar nucleolii, iar celula îşi recapătă aspectul interfazic tipic.

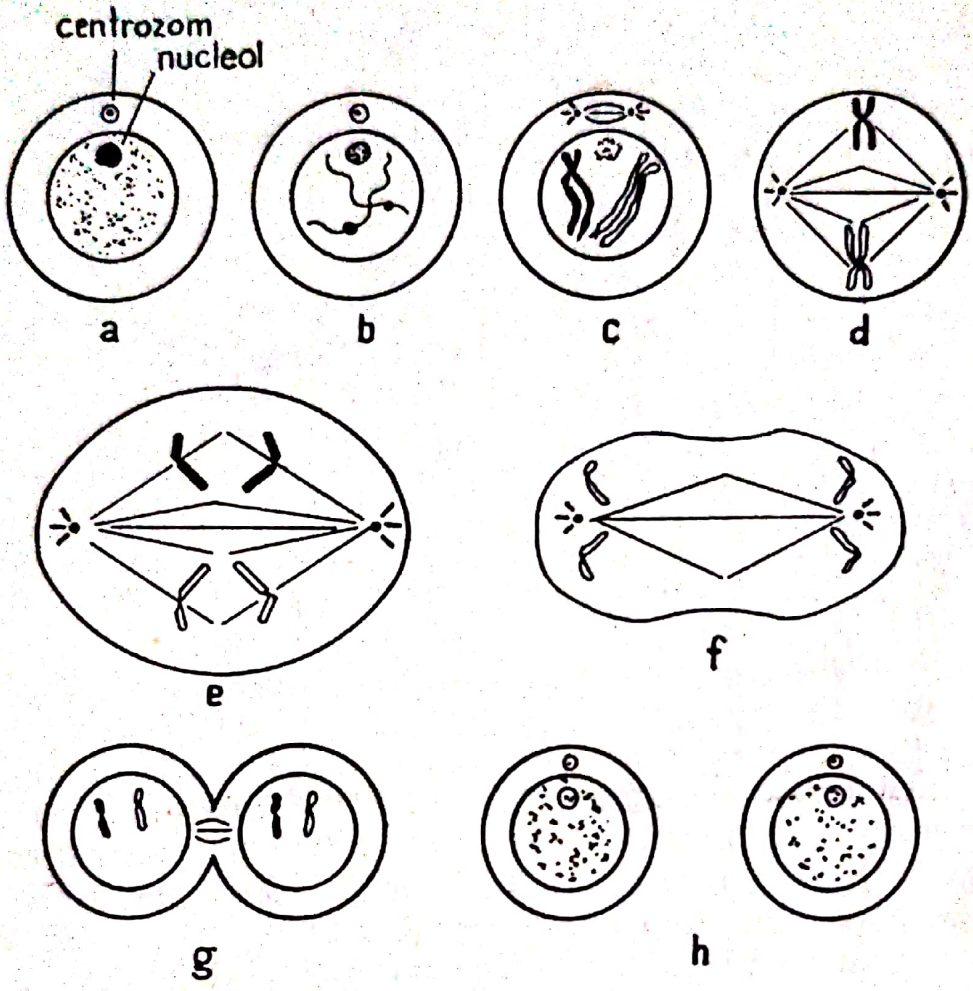


Fig. 2 — Fazele mitozei:
a) celulă interfazică; *b*) profază precoce; *c*) profază tardivă; *d*) metafază; *e*) anafază precoce; *f*) anafază tardivă; *g*) telofază; *h*) celule postmitotice.

2.3. **Aspectul general al cromozomilor metafazici**

Celulele somatice umane conţin 46 de cromozomi. Dintre animalele utilizate în mod curent în cercetările de oncologie experimentală, şoarecele are 40 de cromozomi, şobolanul — 42, hamsterul sirian — 44, iar hamsterul chinez — 22 de cromozomi.

Scanned with OKEN Scanner

Dintre cei 46 de cromozomi din celulele umane, 44 constituie *cromozomii somatici* sau *autozomii*, iar, doi cromozomi reprezintă *cromozomii sexuali* sau *gonozomii*. Cromozomii sexuali ai femeii sînt identici şi sînt denumiţi cromozomi X. Cromozomii sexuali ai bărbatului sînt deosebiţi şi au fost denumiţi X şi Y. Cei 46 de cromozomi, care reprezintă *numărul diploid* pentru specia umană, sînt dispuşi în 23 perechi, 22 de perechi reprezentînd autozomii, iar o pereche (X, X sau X, Y) alcătuind cromozomii sexuali. Un membru al fiecărei perechi de cromozomi provine de la mamă, iar celălalt membru provine de la tată. *Gameţii* rezultaţi în urma diviziunii reducţionale (meioza) au un set haploid de cromozomi. Ovulele au 22 de autozomi +1 cromozom X, în timp ce spermatozoizii au fie 22 de autozomi +1 cromozom X, fie 22 de autozomi +1 cromozom Y.

Cromozomii metafazici sînt alcătuiţi din două *cromatide* dispuse paralel şi unite numai la nivelul *centromerului*. Regiunea centromerică se colorează mai palid decît restul cromozomului; deoarece la acest nivel se produce o strangulare a cromozomului, ea a fost denumită *constricţie primară*. La nivelul centromerului există o structură specializată, *kinetocorul*, care asigură fixarea cromozomului pe fibrele fusului şi deplasarea sa în timpul anafazei. Extremităţile cromozomilor sînt denumite *telomere*. Se presupune că telomerele au rolul de a „stabiliza" cromozomii. Cromozomii ale căror telomere au fost rupte, devin „lipicioşi" şi au tendinţa de a se uni cu alte fragmente cromozomiale.

Prezenţa centromerului împarte cromozomul în două braţe: braţul scurt (p) şi braţul lung (q). Cînd centromerul este situat la mijlocul cromozomului, pe care îl împarte în două braţe egale, cromozomul este denumit *metacentric*. Cromozomii cu centromerul situat în

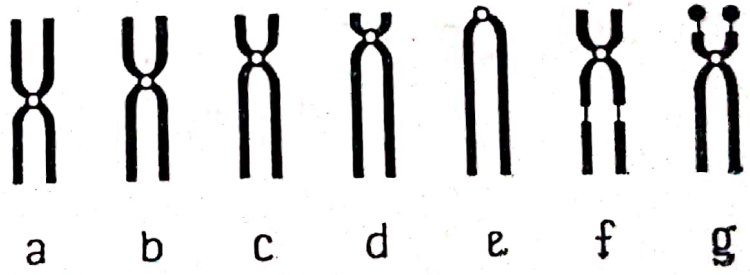


Fig. 3 — Reprezentare schematică a principalelor tipuri de cromozomi:

a) cromozom metacentric; *b*) cromozom submetacentric; *c*) cromozom subtelocentric; *d*) cromozom acrocentric; *e*) cromozom telocentric; *f*) cromozom subtelocentric cu constricţii secundare; *g*) cromozom acrocentric cu sateliţi.

vecinătatea punctului median sînt denumiţi *submetacentrici*, iar cei cu centromerul situat în regiunea subterminală, *subtelocentrici*. Cromozomii *acrocentrici* au centromerul aproape de terminaţie, iar cromozomii *telocentrici* au centromerul terminal (fig. 3).

Pentru caracterizarea morfologică a cromozomilor se utilizează trei criterii: lungimea relativă, indicele centromeric şi raportul braţelor.

Scanned with OKEN Scanner

a) *Lungimea relativă* a unui cromozom este reprezentată de raportul dintre lungimea cromozomului (p+q) și lungimea toală a unui set haploid de cromozomi (22 de autozomi+X):

$$L.rel. = \frac{(p+q) \times 1000}{\sum_{22+X} (p+q)}$$

Lungimea absolută a cromozomilor nu are importanță prea mare pentru caracterizarea cromozomilor, deoarece variază în funcție de stadiul metafazei, comozomii fiind mai lungi în metafaza precoce și mai scurți în metafaza tardivă. Agenții statmokinetici utilizați în mod curent în citogenetică pentru blocarea mitozelor în stadiul de metafază (colchicina, colcemidul) accentuează această scurtare.

b) *Indicele centromeric* este definit prin raportul dintre brațul scurt (p) și lungimea totală a cromozomului (p+q):

$$I.C. = \frac{p}{(p+q)}$$

c) *Raportul brațelor* este reprezentat de dimensiunea brațului lung (q) împărțită la dimensiunea brațului scurt (p):

$$B = \frac{q}{p}$$

La cromozomii metacentrici, raportul brațelor este de 1,0–1,7, la cromozomii submetacentrici de 1,7–3,0, la cromozomii subtelocentrici de 3,0–7,0, la cei acrocentrici de 7,0–∞, iar la cei telocentrici devine ∞.

2.4. **Cariotipul uman**

2.4.1. Generalități

Studiul caracterelor morfologice ale cromozomilor, fotografiați sau desenați, permite identificarea și aranjarea lor sistematizată, alcătuindu-se *cariotipul* celulei. Termenul de *ideogramă* este rezervat pentru reprezentarea diagramatică a unui cariotip, bazată pe măsurarea cromozomilor dintr-un număr mare de celule. Pe baza ideogramei caracteristice unei anumite specii se aranjează cromozomii din celulele individuale studiate. Conform sistemului de nomenclatură adoptat la Denver (14), cele 22 de perechi de autozomi sînt

Scanned with OKEN Scanner

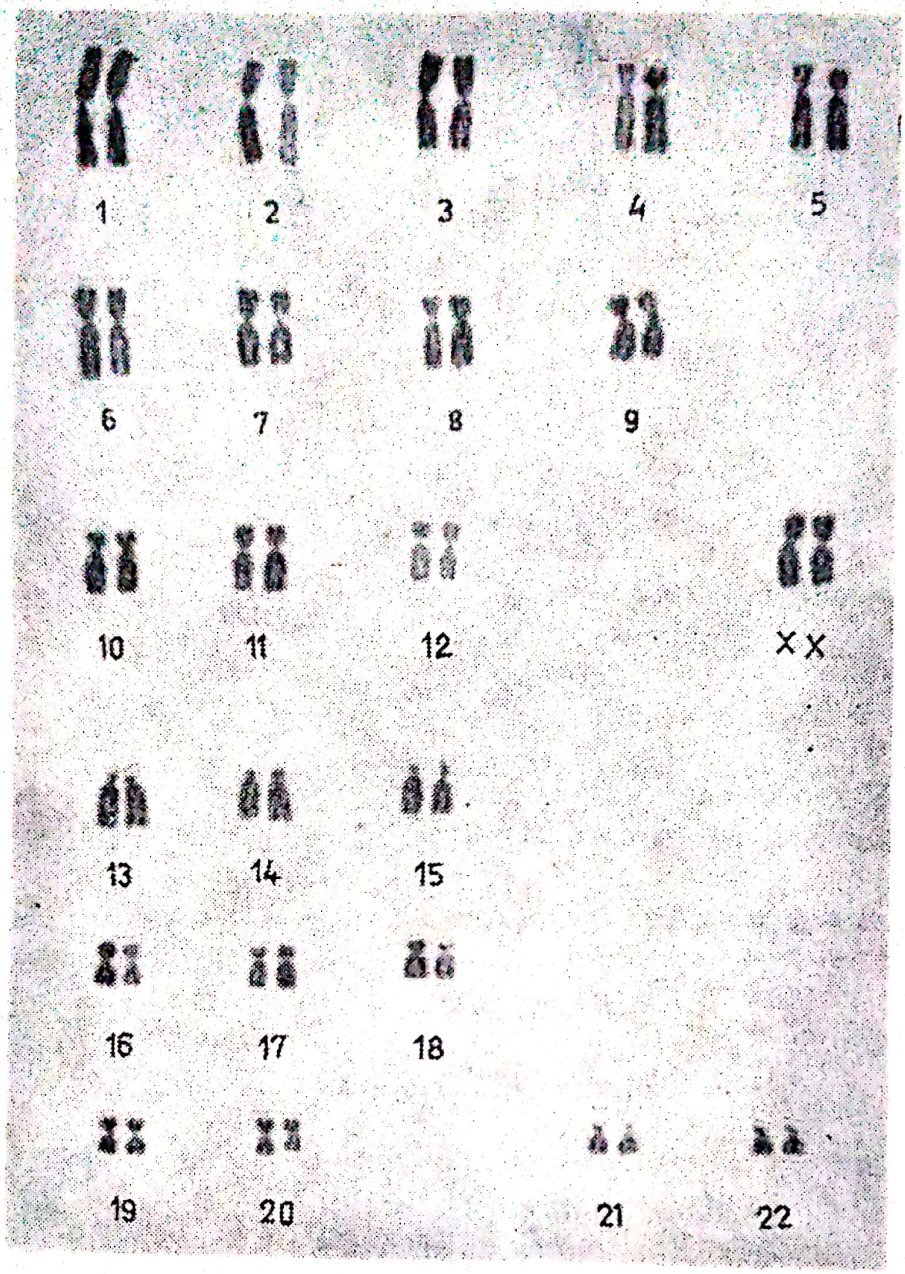


Fig. 4 — Cariotip feminin normal.

aranjate în ordinea descrescîndă a mărimii lor şi numerotate cu numerele 1–22. Pe baza unor trăsături morfologice comune, perechile de autozomi pot fi clasificate în 7 grupe (1–3, 4–5, 6–12, 13–15, 16–18, 19–20, 21–22), care ulterior au fost notate cu literele A–G. Pentru cromozomii sexuali se utilizează în continuare denumirea de X şi Y. Cromozomul X este asemănător cromozomilor din grupa C (perechile 6–12) (fig. 4), iar cromozomul Y are o morfologie asemănătoare cu a cromozomilor din grupa G (perechile 21–22) (fig. 5).

Scanned with OKEN Scanner

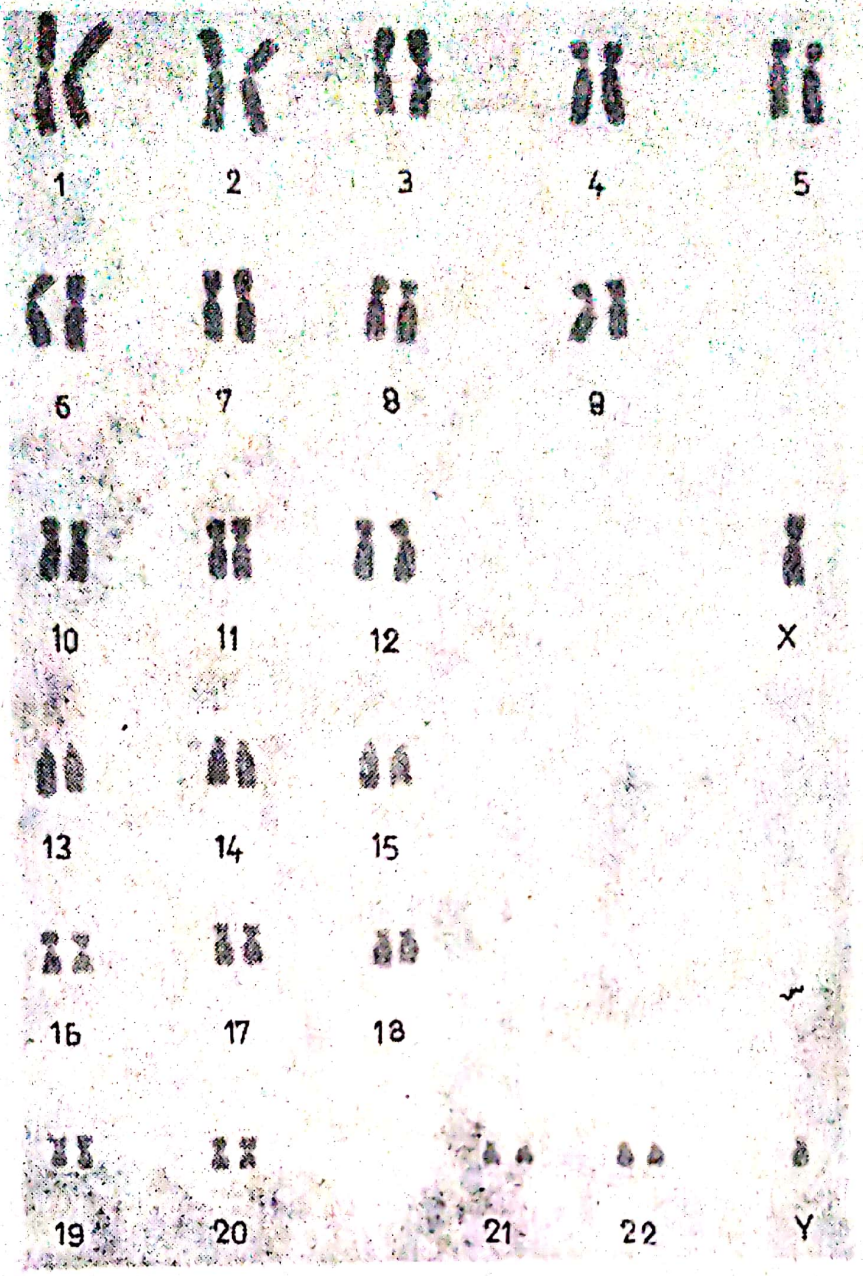


Fig. 5 — Cariotip masculin normal.

2.4.2. Trăsăturile morfologice ale cromozomilor umani

Grupa A (1–3) include cele mai lungi perechi de cromozomi. Perechile 1 și 3 sînt metacentrice, dar pot fi deosebite ușor, cromozomii perechii 3 fiind mai scurți decît cromozomii perechii 1. Perechea 2 are aceeași lungime ca și perechea 1, dar cromozomii perechii 2 sînt submetacentrici.

Scanned with OKEN Scanner

Grupa B (4–5) este alcătuită din cromozomi lungi, submetacentrici. Prin definiție, perechea 4 este mai lungă decît perechea 5, dar diferența de lungime este insuficientă pentru a permite o separare precisă a celor două perechi.

Grupa C (6–12+X) cuprinde cromozomi de mărime mijlocie, cu centromerul dispus median sau submedian. Perechile 6, 7, 8 și 11 sînt definite ca metacentrice, iar perechile 9, 10 și 12 ca submetacentrice. Cromozomii X sînt metacentrici și au o dimensiune similară cu a cromozomilor 6–8. La femei, unul din cromozomii X se replică tardiv în perioada S.

În practică, aceste criterii au însă o valoare foarte mică, iar perechile de cromozomi din grupa C nu pot fi identificate cu certitudine. În absența autoradiografiei, nici cromozomul X nu poate fi deosebit de ceilalți cromozomi din această grupă.

Grupa D (13–15) este alcătuită din 3 perechi de cromozomi acrocentrici satelitați, de dimensiune mijlocie. Perechile de cromozomi din grupa D nu pot fi identificate nici pe baza taliei, nici a trăsăturilor morfologice.

Grupa E (16–18) include 3 perechi de cromozomi care pot fi identificate în mod individual. Cromozomii perechii 16 sînt metacentrici și au adesea o constricție secundară pe partea proximală a brațelor lungi. Cromozomii perechii 17 sînt mai mari și mai metacentrici decît cromozomii perechii 18.

Grupa F (19–20) cuprinde 2 perechi de cromozomi mici, metacentrici, care nu pot fi deosebite între ele.

Grupa G (21–22 +Y) este alcătuită din 2 perechi de cromozomi acrocentrici mici cu sateliți. Cromozomul Y este de obicei mai mare decît cromozomii 21–22 și are brațele dispuse paralel.

2.4.3. Structuri distinctive ale cromozomilor umani

2.4.3.1. *Constricțiile secundare*

Termenul de constricție primară este, după cum am văzut, sinonim cu cel de centromer. Unii cromozomi prezintă însă constricții și în alte regiuni ale brațelor, denumite constricții secundare. Exemple tipice sînt reprezentate de constricțiile de la nivelul extremității terminale a brațelor scurte a cromozomilor acrocentrici, a căror prezență determină apariția sateliților. Alte 4 perechi de cromozomi umani prezintă constricții secundare evidente (1, 9, 16 și Y). Constricțiile secundare ale cromozomilor 1, 9 și 16 sînt localizate

Scanned with OKEN Scanner

pe brațele lungi, în vecinătatea centromerului. Constricția secundară a cromozomului Y este localizată în regiunea mijlocie a brațelor lungi. Sasaki și Makino (56) au observat că după o cultivare de 6 ore într-un mediu lipsit de calciu, constricțiile secundare se accentuează.

Valoarea practică a evidențierii constricțiilor secundare este limitată, deoarece cromozomii 1, 16 și cromozomii Y pot fi recunoscuți cu ușurință pe baza trăsăturilor lor morfologice. Prezența constricțiilor secundare permite însă separarea cromozomilor 9 de ceilalți cromozomi din grupa C.

2.4.3.2. *Sateliții*

Sateliții sînt mase mici de cromatină localizate la extremitatea terminală a brațelor scurte a cromozomilor acrocentrici, de care sînt separate prin constricții secundare accentuate. Toate cele 5 perechi de cromozomi acrocentrici (13–15 și 21–22) pot prezenta sateliți (20), dar numărul cromozomilor satelitați dintr-o celulă este variabil și nu depășește de obicei cifra 9.

Fig. 6 — Asociații satelitare.

Dimensiunile sateliților sînt variabile. Uneori se observă sateliți foarte mari sau „giganți". Întrucît prezența lor nu este însoțită de apariția unor manifestări clinice, ei pot fi considerați variante morfologice normale. În unele cazuri, sateliții înșiși sînt divizați în două porțiuni, datorită unei constricții secundare, alcătuind sateliți dubli.

Extremitățile satelitate ale cromozomilor acrocentrici se asociază adesea în timpul mitozei și al meiozei, fenomen denumit *asociație satelitară* (fig. 6). Există dovezi care demonstrează concludent că formarea nucleolilor este dependentă de constricțiile secundare dintre sateliți și brațul scurt al cromozomilor acrocentrici, care acționează ca *organizatori nucleolari*. Asociațiile satelitare reprezintă astfel fenomene secundare, legate de îndeplinirea acestui rol.

Scanned with OKEN Scanner

2.5. Autoradiografia cromozomilor umani

2.5.1. Introducere

Tehnica autoradiografică se bazează pe proprietatea celulelor de a încorpora anumite substanţe marcate cu izotopi radioactivi. Localizarea substanţelor încorporate este realizată prin acoperirea lamei pe care sînt prezente celulele cu o emulsie fotografică ce va fi impresionată de radiaţiile emise de izotopi, rezultînd granule a căror distribuţie poate fi examinată la microscop.

Autoradiografia cromozomilor pune două probleme: alegerea compusului care va fi încorporat şi alegerea izotopului. *Compusul* trebuie să fie încorporat în mod specific în ADN. ADN şi ARN prezintă trei baze comune: adenina, guanina şí citozina. Cea de a patra bază este diferită, ADN-ul conţinînd timină, iar ARN-ul conţinînd uracil. Din acest motiv, în autoradiografia cromozomilor se utilizează dezoxiribozida timinei, timidina, care este încorporată în ADN-ul celular datorită activităţii timidinkinazei. *Izotopul* care îndeplineşte condiţiile necesare autoradiografiei este tritiul (H^3) (22,57). Acesta emite numai radiaţii beta, al căror parcurs mediu este de 1,5 microni. Utilizarea tritiului permite o rezoluţie înaltă deoarece, spre deosebire de izotopii cu energie mare, o dezintegrare unică produce o singură urmă vizibilă pe emulsia fotografică. Datorită parcursului scurt al radiaţiilor emise de tritiu, granulele de bromură de argint ale emulsiei aflate la o distanţă mai mare de 1 micron de sursa radioactivă nu sînt impresionate.

Primul indiciu asupra faptului că replicarea ADN-ului nu decurge sincron în toţi cromozomii provine din experienţele lui Lima-de-Faria (33), care a observat că unul din cromozomii din spermatocitele insectei *Melanoplus differentialis* îşi continuă replicarea după ce replicarea celorlalţí cromozomi a încetat. Acest element, aflat în afara ciclului de replicare al majorităţii cromozomilor (alociclic), este cromozomul X.

Ulterior, Wimber (69) a observat că asincronia replicativă interesează şi diferitele porţiuni ale aceluiaşi cromozom, unele segmente continuînd activitatea replicativă după ce replicarea altor segmente încetase.

În celulele femeilor, unul din cromozomii X se replică în acelaşi timp cu autozomii. Celălalt cromozom X se replică numai spre sfîrşitul perioadei S, cînd majoritatea autozomilor şi-au terminat replicarea ADN-ului. Cromozomii X din celulele anormale cu 3, 4 sau 5 cromozomi X prezintă de asemenea o replicare tardivă. În decursul

Scanned with OKEN Scanner

interfazei, acești cromozomi vor alcătui particulele de cromatină sexuală.

Faptul că autozomii omologi au o replicare sincronă, permite utilizarea autoradiografiei ca un criteriu suplimentar de identificare a cromozomilor.

Dacă timidina tritiată este prezentă în mediul de cultură de la începutul fazei S, ea va fi treptat încorporată în toți cromozomii, cu tot asincronismul replicativ existent între ei. Marcarea generalizată care rezultă face imposibilă recunoașterea unor modele individuale de replicare. Din acest motiv, este mai utilă marcarea în etapa finală a fazei S. În această perioadă, unii cromozomi sau segmente și-au terminat replicarea, nu mai încorporează izotop și apar nemarcați pe autoradiografie. Cromozomii, sau segmentele de cromozomi care nu și-au terminat replicarea, încorporează izotopul radioactiv într-o secvență specifică și vor fi astfel recunoscuți.

Pentru identificarea cromozomilor se utilizează două criterii: distribuția și numărul granulelor de argint.

2.5.2. Identificarea cromozomilor cu ajutorul autoradiografiei

Grupa A. Replicarea cromozomilor din grupa A decurge sincron, astfel încît autoradiografia nu aduce criterii utile pentru diferențiere.

Grupa B. Cromozomii perechii 4 se replică tardiv pe toată lungimea lor. Deoarece cromozomii perechii 5 își termină destul de precoce replicarea brațelor lungi, numai brațele scurte vor apărea marcate.

Grupa C. Cromozomii din această grupă nu pot fi recunoscuți nici autoradiografic. La femei, unul din cromozomii X poate fi identificat datorită proprietății de replicare tardivă.

Grupa D. Cromozomii grupei D pot fi recunoscuți prin marcare în stadiul final al fazei S. Perechea 13, care se replică tardiv, se marchează în regiunea distală și mijlocie a brațelor lungi. Perechea 15, care își termină sinteza mai devreme, se marchează numai în regiunea centromerică. Perechea 14 prezintă o replicare intermediară și se marchează la nivelul centromeruliu și al extremității distale a brațelor lungi.

Grupa E. Cromozomii grupei E prezintă modele diferite de replicare și pot fi recunoscuți autoradiografic. Cromozomii 16 prezintă o regiune cu replicare tardivă pe partea proximală a brațelor lungi. Cromozomii 17 își termină sinteza de ADN foarte timpuriu.

Scanned with OKEN Scanner

Cromozomii 18 se replică tardiv și pot fi astfel deosebiți de cromozomii 17.

Grupa F. Cromozomii grupei F nu pot fi deosebiți autoradiografic.

Grupa G. Cromozomii grupei 21 se replică mai tîrziu decît cromozomii 22. Replicarea cromozomului Y este de obicei mai tardivă decît a cromozomilor 21–22 (21, 48).

2.6. Heterocromatina constitutivă și facultativă. Benzile C

Cercetările citologice ale lui Heitz (25) au demonstrat că în constituția cromozomilor intră două tipuri de cromatină: *eucromatina*, care se condensează în timpul mitozei și se decondensează în decursul interfazei, și *heterocromatina*, care rămîne condensată în tot timpul ciclului celular. În timpul interfazei, heterocromatina este vizibilă sub forma unor blocuri intens colorate (cromocentrii). Deși aceste date sugerau că heterocromatina este limitată la anumite regiuni ale cromozomilor, localizarea heterocromatinei nu a putut fi precizată, deoarece cromozomii nu pot fi identificați în interfază. În metafază, cînd morfologia cromozomilor este bine definită, diferențele de colorabilitate dintre eucromatină și heterocromatină dispar, deoarece atît segmentele heterocromatice, cît și eucromatina sînt condensate.

La mamifere există două tipuri de heterocromatină: heterocromatina constitutivă și heterocromatina facultativă. *Heterocromatina constitutivă* este lipsită de gene structurale, dar are proprietatea de a inhiba expresia fenotipică a genelor structurale din segmentele eucromatice învecinate, datorită unui efect de poziție. *Heterocromatina facultativă* conține gene structurale, dar devine condensată și genetic inactivă în decursul dezvoltării organismului. Heterocromatina facultativă este exemplificată de unul din cromozomii X ai femeii, a cărui inactivare are drept rezultat egalizarea expresiei fenotipice a genelor localizate pe cromozomul X între cele două sexe. Întrucît cromozomul X se replică tardiv, s-a sugerat posibilitatea de a utiliza autoradiografia pentru identificarea segmentelor heterocromatice. Metoda autoradiografică prezintă însă două mari neajunsuri: nu permite distincția între heterocromatina constitutivă și facultativă; este insuficient de sensibilă pentru a detecta prezența unor piese heterocromatice mici.

Tehnicile citologice de localizare a heterocromatinei constitutive își au originea în experiențe de biochimie efectuate în jurul anului

Scanned with OKEN Scanner

1960. Prin centrifugare în gradient de clorură de cesiu a ADN-ului provenit de la diferite specii s-a observat că o componentă minoră, denumită *ADN satelit*, avea o densitate de plutire diferită de a masei principale de ADN (30, 64). Prin experienţe de hibridare *in situ*, Pardue şi Gall (46) şi Jones (28) au arătat că ADN-ul satelit este localizat în regiunea centromerică a cromozomilor metafazici. Metodele de hibridare *in situ* se bazează pe faptul că numai catenele unice de ADN care au secvenţe complementare de baze pot hibrida. ADN-ul din cromozomii metafazelor de pe preparatele citogenetice este mai întîi denaturat prin tratare cu o soluţie de NaOH. Preparatele sînt apoi incubate într-o soluţie de acizi nucleici monocatenari marcaţi cu tritiu. Acizii nucleici din soluţie vor hibrida numai cu regiunile cromozomiale care conţin secvenţe complementare de baze, iar localizarea lor este evidenţiată prin autoradiografie. Metodele de hibridare nu sînt suficient de sensibile pentru a detecta secvenţele unice de ADN. Cu ajutorul lor se evidenţiază segmentele de *ADN repetitiv* (satelit), alcătuite din secvenţe identice de ADN care se repetă de foarte multe ori (59). ADN-ul satelit al mamiferelor este alcătuit din copii identice, care se repetă de aproximativ 10^6 ori. Aceste secvenţe nu sînt transcrise în ARN în vederea sintezei proteice. Spre deosebire de heterocromatină, eucromatina este alcătuită din secvenţe nucleotidice unice şi specifice, alcătuind genele, care în timpul interfazei sînt transcrise în ARN mesager, direcţionînd asamblarea unor proteine specifice.

Tehnica de evidenţiere a heterocromatinei prin hibridare *in situ* este însă destul de laborioasă. Din acest motiv, în practica curentă se utilizează tehnicile simplificate ale lui Arrighi şi Hsu (1) şi Yunis şi colab. (70). Metoda lui Arrighi şi Hsu (1) constă în denaturarea cromozomilor într-o soluţie de NaOH 0,07 N, urmată de o incubare de 12 ore în 2×SSC (o soluţie care conţine NaCl 0,3 M şi citrat trisodic 0,03 M) la 65°. Yunis (70) utilizează o denaturare la 85–100° în tampon fosfat 0,06 M, urmată de o incubare de 10 ore în acelaşi tampon la 65°. Preparatele tratate după una din aceste tehnici sînt apoi colorate cu soluţie Giemsa. Heterocromatina apare sub forma unor blocuri intens colorate, localizate centromeric, în timp ce braţele cromozomilor se colorează palid (fig. 7). Cei doi cromozomi X se colorează asemănător cu autozomii, deci este evidenţiată numai heterocromatina constitutivă, nu şi cea facultativă.

Substratul exact al reacţiei de colorare diferenţială a heterocromatinei constitutive nu este complet elucidat, dar se poate presupune că ADN-ul înalt repetitiv renaturează în condiţiile utilizate, în timp ce ADN cu secvenţe unice nu renaturează.

Scanned with OKEN Scanner

Conferința de la Paris asupra standardizării în citogenetica umană (47) a decis ca blocurile centromerice de heterocromatină constitutivă să fie denumite *benzi* C, pentru a fi deosebite de alte tipuri de benzi. Cantitatea și localizarea heterocromatinei este caracteristică pentru fiecare pereche de cromozomi umani. Blocurile heterocromatice cele

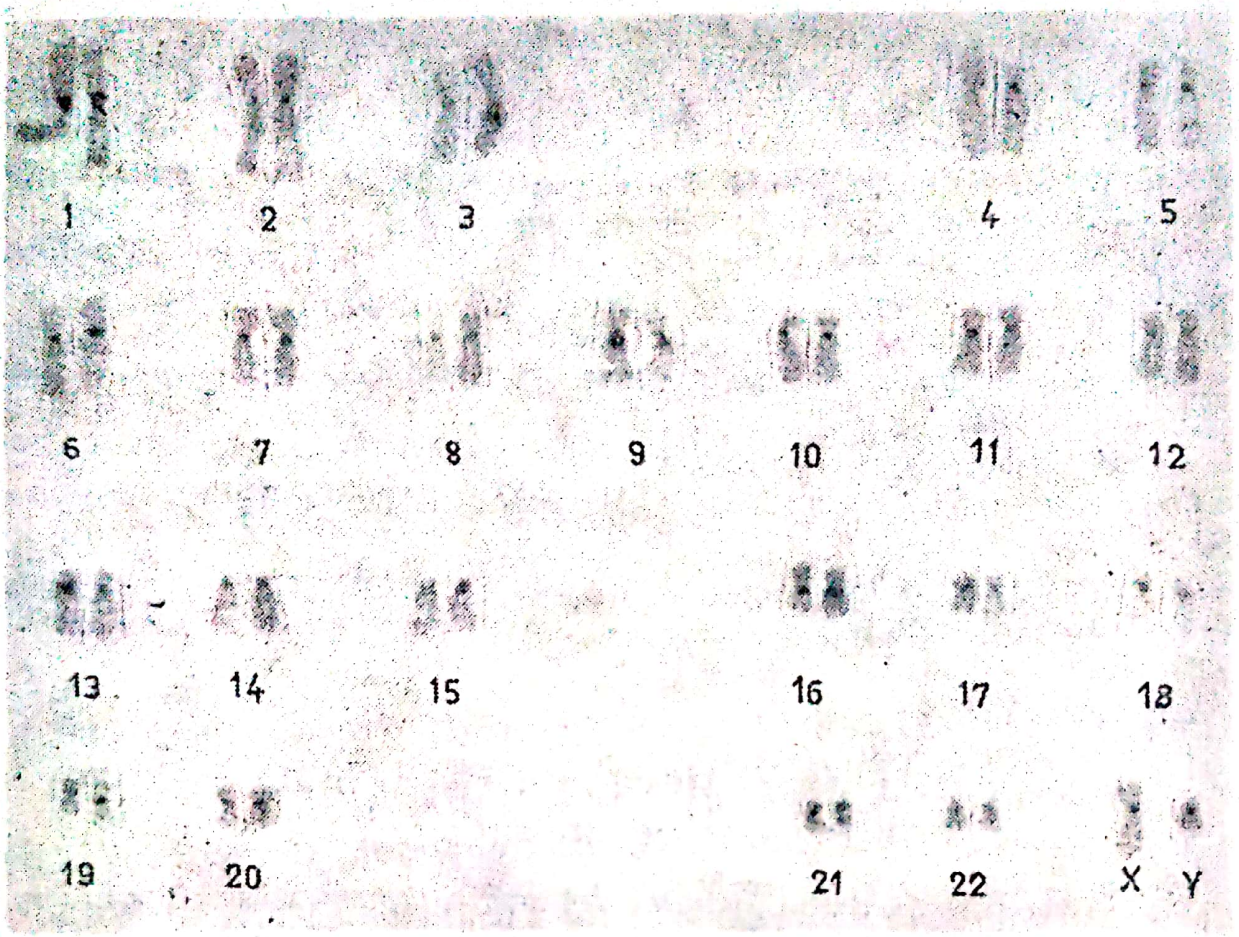


Fig. 7 — Cariotip uman prezentînd benzi C.

mai mari sînt observate în regiunile paracentromerice ale cromozomilor care prezintă constricții secundare accentuate: 1, 9 și 16. Cantitatea de heterocromatină prezentă pe cromozomii diferitelor persoane prezintă un polimorfism accentuat. Aceste variații nu sînt însoțite de efecte fenotipice, heterocromatina constitutivă fiind lipsită de gene structurale.

La unele specii au fost observate benzi C cu localizare *interstițială* sau *terminală*. Ele ar putea proveni din regiunile centromerice prin procese de inversie sau translocație.

Rolul exact al ADN-ului repetitiv din heterocromatina constitutivă nu este cunoscut. Hsu (27) discută următoarele funcții posibile:

a) Organizarea microtubulilor fusului (heterocromatina centromerică). Stubblefield (63) presupune că kinetocorul este un segment

Scanned with OKEN Scanner

genetic programat pentru activitate în decursul mitozei, cînd restul cromozomului este inactiv. La acest nivel s-ar genera un lanț de ARN mesager pe care s-ar agrega proteinele microtubulilor.

b) Împerecherea cromozomilor omologi în meioză. Acest rol este discutabil, deoarece ADN-ul satelit din heterocromatina centromerică a tuturor cromozomilor prezintă secvențe identice de baze, ceea ce ar facilita și împerecherea cromozomilor neomologi.

c) Heterocromatina constitutivă asociată cu organizatorii nucleolari (constricțiile secundare dintre sateliții și brațele scurte ale cromozomilor acrocentrici) ar avea rolul de a proteja genele localizate la acest nivel (71). În acest sens, menționăm faptul că cercetările de microscopie electronică combinate cu citochimia și autoradiografia au demonstrat existența unei continuități între heterocromatina perinucleolară și organizatorii nucleolari.

d) Stabilizarea terminațiilor cromozomiale (heterocromatina telomerică).

e) Heterocromatina interstițială ar putea interveni în reglarea funcției genelor din eucromatina învecinată, datorită unui efect de poziție (10).

f) Protejarea eucromatinei vitale de acțiunea agenților mutageni, heterocromatina formînd un „scut" pe suprafața exterioară a nucleului (27).

2.7. **Diferențierea longitudinală a cromozomilor umani**

La începutul acestei decade au fost puse la punct metode de evidențiere a unor benzi transversale pe brațele cromozomilor. Aceste metode, care permit recunoașterea exactă a tuturor cromozomilor și identificarea precisă a anomaliilor structurale fine, au revoluționat citogenetica (27), astfel încît cercetările din epoca anterioară apariției lor sînt privite cu indulgența rezervată de obicei realizărilor din epoca de piatră.

2.7.1. Benzile Q

Prima dintre tehnicile care permit diferențierea longitudinală a cromozomilor a fost descrisă de Caspersson și colab. (5–8). Tehnica lui Caspersson se bazează pe ipoteza că diferențele de organizare biochimică a cromozomilor (reflectate printr-o dispoziție particulară a perechilor de baze adenină-timină și guanină-citozină) ar putea fi evidențiate prin atașarea unui fluorocrom de o

Scanned with OKEN Scanner

substanță care atacă în mod specific anumite baze. Primul fluorocrom utilizat a fost quinacrina muștar (QM), care îndeplinește două condiții (67): prezintă un nucleu amino-acridinic care se intercalează în dubla elice a ADN-ului; posedă o grupare alchilantă capabilă să formeze legături covalente cu guanina din ADN.

După colorare cu quinacrină muștar și examinare în lumină ultravioletă, cromozomii prezintă benzi transversale fluorescente (benzile Q), alternînd cu benzi întunecate. Acestea interesează ambele cromatide și au dispoziție similară în cromozomii omologi. Numărul, dimensiunea, intensitatea și distribuția benzilor sînt caracteristice pentru fiecare pereche de cromozomi. Brațul distal al cromozomului Y prezintă o fluorescență deosebit de intensă (72), fapt care permite identificarea rapidă a acestui cromozom. Pearson și colab. (50) au observat că în celulele provenite de la bărbați există un corpuscul fluorescent cu un diametru de aproximativ 0,25 microni. Acest corpuscul, care corespunde cromozomului Y, a fost denumit corpuscul Y și permite diagnosticul sexului în nucleii interfazici. Alte zone intens fluorescente au fost observate la nivelul regiunilor centromerice ale cromozomilor 3 și 4 și pe brațele scurte și sateliții cromozomilor acrocentrici (13–15, 21–22). Unele regiuni cromozomiale și îndeosebi regiunea heterocromatică a cromozomului 9 prezintă fluorescență extrem de redusă.

Mecanismul de apariție a benzilor Q nu este precizat. La început se credea că fluorescența QM ar fi determinată de prezența grupării muștar și că benzile fluorescente ar reflecta existența unor grupări bogate în guanină-citozină. Ulterior, s-a observat însă că clorhidratul de acridină, care nu are nici o grupare alchilantă, induce benzi cu o dispoziție identică cu cele datorite QM (68). Mai mult, cercetări recente au demonstrat că regiunile intens fluorescente corespund unor zone de ADN bogate în adenină și timină.

Examenul cromozomilor cu ajutorul benzilor Q a contribuit la clarificarea multor aspecte teoretice și practice ale citogeneticii. Tehnica implică însă utilizarea unui echipament costisitor, iar fluorescența nu este permanentă, astfel încît imaginile trebuie înregistrate imediat prin fotografiere. Din aceste motive, bandarea Q a fost treptat înlocuită – cel puțin pentru examinările de rutină – cu tehnicile de bandare Giemsa.

2.7.2. Benzile Giemsa (G)

Benzile G sînt benzi transversale dispuse pe brațele cromozomilor, care apar prin tratarea preparatelor cromozomiale cu diferite tehnici, urmată de colorație Giemsa.

Scanned with OKEN Scanner

Primele metode de bandare (15, 49, 58, 65) au reprezentat variante ale procedeului de obținere a benzilor C. Principiul acestor metode constă în incubarea preparatelor citologice în diferite soluții tampon, la temperatura de 60–65°, timp de 2–24 de ore. Ulterior, Dutrillaux și colab. (17) și Seabright (60) au demonstrat că benzile cromozomiale pot fi obținute prin simpla tratare a lamelor cu soluții enzimatice (pronază, tripsină) și colorare Giemsa.

Dispoziția benzilor G (fig. 8) este similară cu a benzilor Q, în sensul că benzile colorate intens cu soluție Giemsa corespund benzilor fluorescente relevate de coloratia cu quinacrină. Unele regiuni cromozomiale care nu sînt fluorescente, dar care sînt intens colorate cu tehnicile de bandare C, sînt bine evidențiate și de tehnicile de bandare G. Regiunea heterocromatică de la nivelul constricției paracentromerice a cromozomului 9, care se colorează intens cu metodele de bandare C, nu poate fi pusă în evidență cu tehnicile Q sau G.

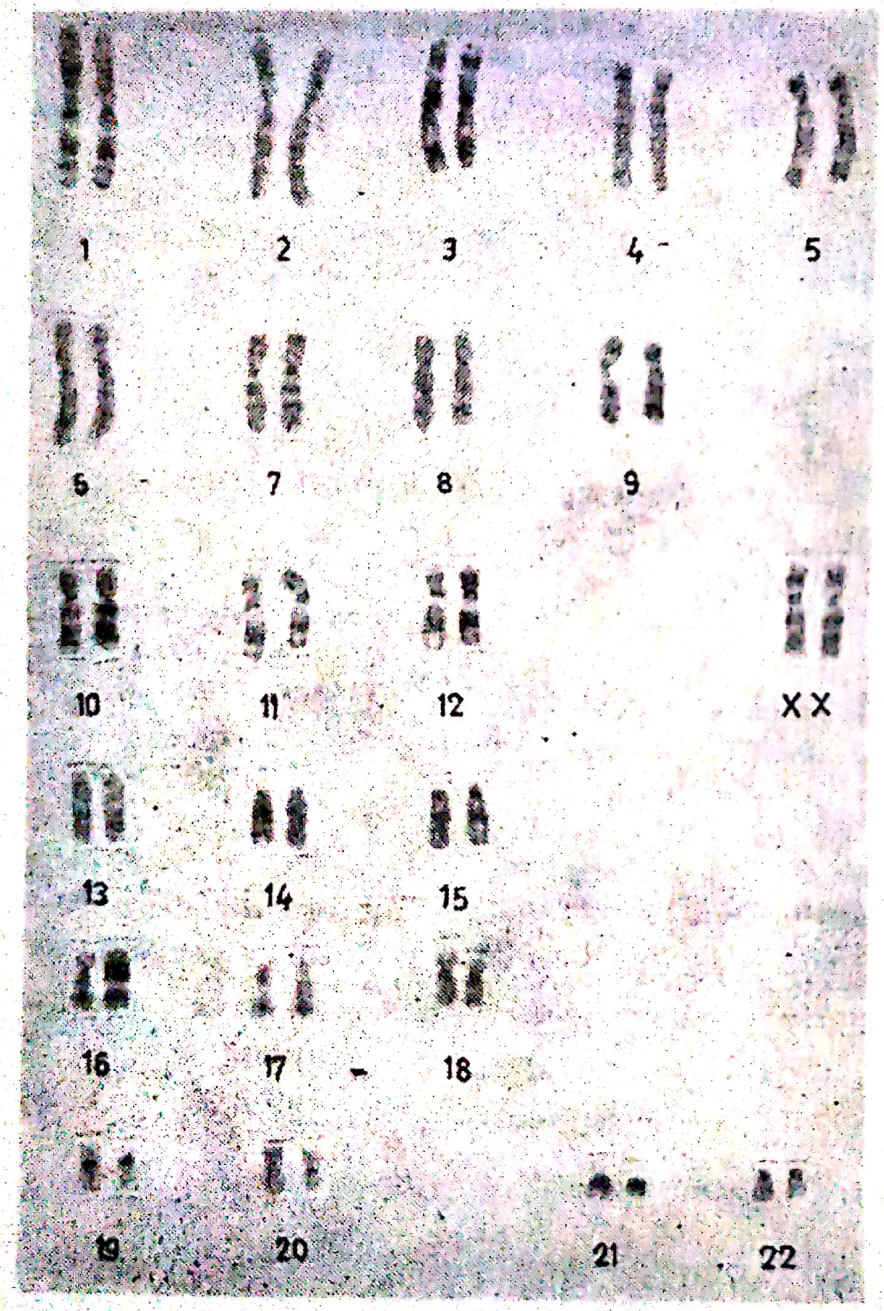


Fig. 8 — Cariotip uman prezentînd benzi G.

Natura benzilor G nu este cunoscută. Întrucît primele tehnici de obținere a benzilor G erau asemănătoare cu procedeele de bandare C, s-a presupus că mecanismul de apariție a celor două tipuri de benzi ar fi asemănător, implicînd denaturarea și reasocierea ADN-ului repetitiv. Apariția benzilor G după tratarea cu pro-

Scanned with OKEN Scanner

nază sau tripsină nu poate fi însă explicată prin acest mecanism, deoarece aceste enzime nu interacționează cu ADN-ul. Kato și Moriwaki (29), care au observat că benzile G pot fi produse prin tratare cu substanțe care denaturează proteinele (ureea, guanidina-HCl) sau cu detergenți, au sugerat că structura bandată a cromozomilor este datorită solubilizării sau extragerii unor proteine cromozomiale, probabil de natură acidă.

O altă posibilitate este ca atît ADN-ul, cît și proteinele să intervină în reacțiile citochimice care stau la baza apariției benzilor. Hsu (27) a menționat mai multe argumente în favoarea acestei ipoteze: a) benzile G au aceeași dispoziție ca și benzile Q; b) ureea clivează proteinele de pe ADN; c) actinomicina D introdusă în culturi poate produce benzi G în absența oricărui tratament ulterior. Este posibil ca legarea acestui antibiotic în anumite regiuni ale ADN-ului să interfereze cu legarea proteinelor.

2.7.3. Benzile R

Benzile R sînt obținute prin tratarea preparatelor cromozomiale la o temperatură superioară celei utilizate pentru evidențierea benzilor G (86–87°) (18). Ele au o dispoziție inversă („revers bands") față de a benzilor G, în sensul că benzile intens colorate pe preparatele R corespund unor benzi G palide și invers.

2.7.4. Benzile T

Prin colorare cu acridină oranj și examinare în lumină ultravioletă a preparatelor tratate în prealabil prin căldură se obțin benzi fluorescente avînd dispoziția benzilor R (16). Benzile terminale (telomerice) emit însă o fluorescență deosebit de intensă și pot fi ușor deosebite de celelalte benzi cromozomiale. Marcarea T permite astfel recunoașterea accidentelor de structură care interesează segmentele terminale ale cromatidelor.

2.8. Anomaliile cromozomiale și originea lor

Procesul de mitoză asigură repartizarea egală a materialului genetic în celulele fiice și condiționează astfel identitatea dintre celulele fiice și celula parentală. În anumite condiții, au însă loc

Scanned with OKEN Scanner

modificări genotipice denumite mutații. Mutațiile pot fi genice și cromozomiale. Mutația genică constă în modificarea arhitecturii moleculare a ADN-ului. Întrucît nu determină o schimbare a aspectului morfologic al cromozomilor, mutațiile genice nu pot fi decelate decît atunci cînd produc efecte fenotipice evidente. Mutațiile cromozomiale constau în modificări ale numărului sau structurii cromozomilor și pot fi detectate la microscopul optic.

2.8.1. Modificări cromozomiale numerice

2.8.1.1. *Generalități*

Înainte de a expune mecanismele și semnificația modificărilor cromozomiale numerice este necesară definirea termenilor care vor fi utilizați (23).

Termenul de *haploid* este întrebuințat în două sensuri: *n* se referă la numărul de cromozomi din gameți, în comparație cu numărul diploid de cromozomi din celulele somatice (2n); *x* reprezintă numărul de bază al unei serii poliploide, astfel încît celulele 3x, 4x, 5x etc. sînt triploide, tetraploide, pentaploide etc.

Atunci cînd numerele de cromozomi din celule reprezintă multipli exacți ai numărului de bază haploid (n), se vorbește despre *euploidie*. Celulele cu n, 2n, 3n, 4n, 5n etc. cromozomi sînt euploide.

Numerele *aneuploide* de cromozomi nu corespund multiplilor exacți ai numărului haploid (n), de exemplu: $2n \pm 1$, $2n \pm 2$, $4n \pm 1$, $4n \pm 2$ etc.

Prefixul de *hiper-* sau *hipo-* indică un număr aneuploid de cromozomi avînd o deviație redusă în raport cu numărul euploid. În categoria hipodiploidiei sînt cuprinse celulele monosomice (2n–1), în care un membru al unei perechi de cromozomi lipsește, și celulele nulisomice (2n–2), în care ambii membri ai unei anumite perechi sînt absenți. Celulele hiperdiploide pot fi trisomice (2n+1), cînd au un cromozom suplimentar, sau tetrasomice (2n+2), cînd în locul unei perechi există 4 cromozomi omologi. În cazul trisomiilor duble, există doi cromozomi suplimentari, aparținînd însă unor perechi diferite (2n+1+1).

Noțiunea de *heteroploidie* este mai largă și include toate deviațiile față de numărul normal de cromozomi, caracteristic speciei.

Termenul de *mozaicism cromozomial* sau *mixoploidie* se referă la situațiile în care coexistă două sau mai multe populații celulare diferite.

Scanned with OKEN Scanner

Tumorile maligne se caracterizează printr-o oarecare variabilitate a numărului de cromozomi din celule. *Numărul modal* al unei tumori caracterizează populația celulară majoritară din tumoarea respectivă. Astfel, dacă distribuția numerelor de cromozomi dintr-o tumoare corespunde histogramei din fig. 9, numărul modal este 66, deoarece majoritatea celulelor au 66 de cromozomi.

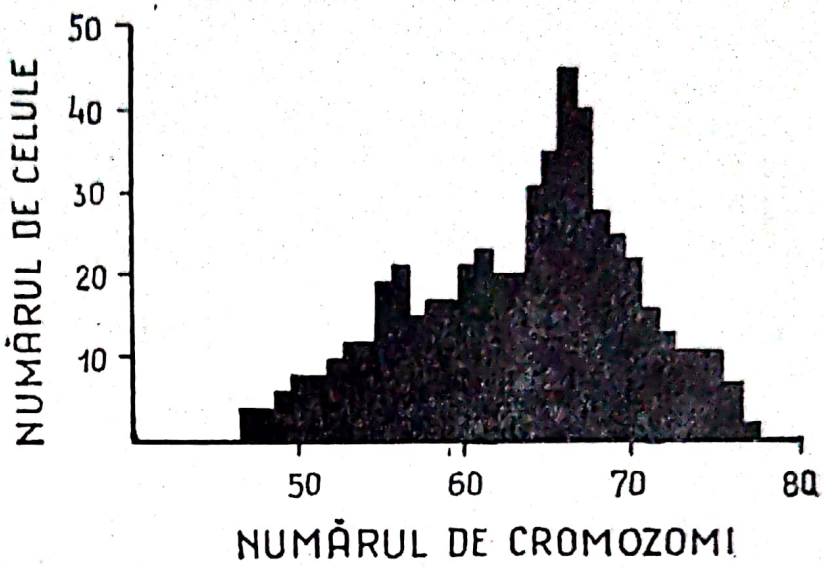


Fig. 9 — Histogramă reprezentînd distribuția numerelor de cromozomi din celulele unui carcinom ovarian.

2.8.1.2. *Originea aneuploidiei*

Cauzele principale ale aneuploidiei sînt nondisjuncția și pierderea de cromozomi datorită procesului de retardare anafazică.

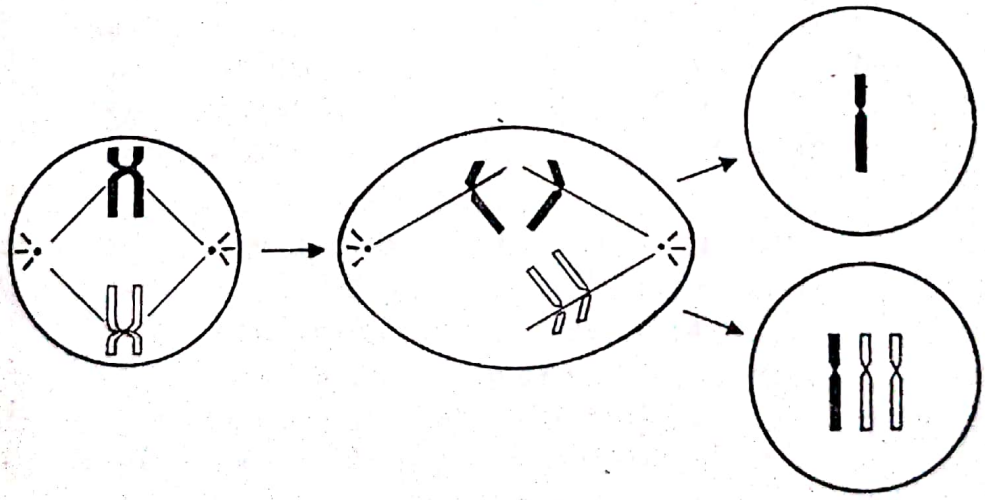


Fig. 10 — Mecanismul nondisjuncției cromozomiale.

În cazul *nondisjuncției* (fig. 10), cromatidele omoloage nu se separă (disjuncție) în decursul mitozei pentru a se repartiza în cele două celule fiice, ci rămîn împreună în una din celulele fiice. Con-

Scanned with OKEN Scanner

secința nondisjuncției este apariția a două celule fiice anormale: una trisomică și una monosomică pentru cromozomul în cauză. Dacă ambele linii celulare rezultate sînt viabile, organismul va conține două linii celulare aneuploide, pe lîngă linia normală deja prezentă (mozaicism).

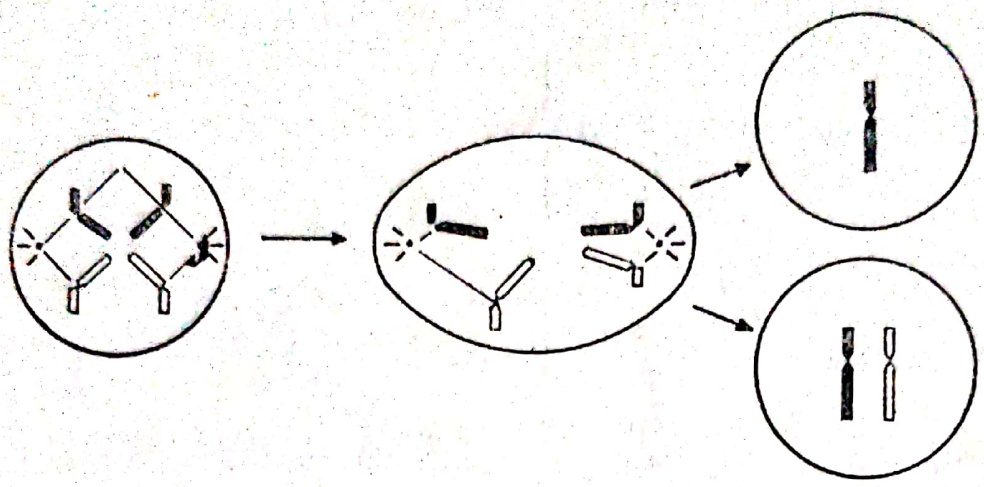


Fig. 11 — Mecanismul retardării anafazice.

Procesul de *retardare anafazică* (fig. 11) reprezintă o altă cauză a pierderii de cromozomi. În decursul anafazei, unul sau cîțiva cromozomi nu se deplasează spre polii celulei astfel încît, după ce membrana celulară se reface în telofază, ei sînt excluși din nucleu și pierduți (21).

Endoreduplicarea selectivă a fost definită de Lejeune (31) ca o replicare dublă a unei părți din genom (un cromozom întreg sau o parte a unui cromozom). Realitatea endoreduplicării selective a fost demonstrată prin evidențierea unui cromozom suplimentar (sau a unui segment de cromozom) dispus alături de cromozomul omolog normal.

Poliploidizarea nucleului se realizează prin endomitoză sau endoreduplicare. În cazul *endomitozei*, cromozomii se comportă normal pînă în stadiul de profază tardivă. Membrana nucleară nu se resoarbe însă, iar fusul nuclear nu se formează. Cromozomii se clivează totuși, cromatidele devenite independente se despiralizează progresiv, iar nucleul ia aspect interfazic. *Endoreduplicarea* se caracterizează printr-o reduplicare dublă a cromozomilor, care are loc în interfază. În profază și metafază se evidențiază un număr dublu de cromozomi. Procesul de separare a cromozomilor se desfășoară normal, dar el operează pe o garnitură cromozomială dublă și va duce în final la apariția a două celule tetraploide.

Scanned with OKEN Scanner

Mitozele multipolare, frecvente în celulele canceroase, sînt o cauză importantă a aneuploidiei. Ele sînt consecința formării unui fus multipolar datorită unor diviziuni succesive ale centrozomului și determină repartizarea inegală a cromozomilor în celulele fiice.

2.8.2. Rearanjamentele structurale ale cromozomilor

Rearanjamentele structurale ale cromozomilor sînt consecința rupturilor cromozomiale. Rupturile sînt întreruperi ale continuității cromozomilor, care pot avea trei consecințe: *a*) reunirea fragmentelor cu refacerea structurii inițiale a cromozomului (restituție); *b*) reunire cu modificarea structurii cromozomului, rezultînd aberații cromozomiale; *c*) lipsa reunirii, cu pierderea fragmentului rupt.

2.8.2.1. *Ruptura cromozomială*

Agenții care pot provoca apariția rupturilor cromozomiale (clasmatogeni) sînt extrem de variați. Ei pot fi clasificați în factori externi (radiații, substanțe chimice, virusuri) și factori interni (afecțiuni ereditare, îmbătrînirea). *Radiațiile ionizante*, făcînd parte din fondul cosmic natural, acționează continuu asupra omului. Expunerile la doze mari de radiații sînt cauzate de iradierile profesionale sau medicale. În grupa *agenților chimici* intră substanțe extrem de numeroase, unele dintre ele utilizate pe scară largă (cafeina, clorpromazina, substanțele halucinogene). Consecințele acțiunii *virusurilor*, atît a celor infecțioase (virusul rubeolei, virusul hepatitei epidemice etc.), cît și a celor oncogene (virusul polyoma, virusul SV40 etc.) sînt extrem de grave, iar tabloul modificărilor cromozomiale este complex și polimorf. În unele *afecțiuni ereditare* (sindromul Bloom, anemia Fanconi, ataxia-teleangiectazia) există un nivel crescut de rupturi cromozomiale. Persoanele care suferă de aceste boli prezintă o incidență crescută a neoplaziilor. *Îmbătrînirea* cauzează mai ales anomalii numerice, crescînd frecvența accidentelor mitotice datorite nondisjuncției. Anomaliile cromozomiale consecutive îmbătrînirii ar putea constitui o reflectare a efectului cumulativ al factorilor externi, dar influențarea directă a proceselor fiziologice celulare nu poate fi exclusă.

Rupturile cromozomiale devin evidente în metafază, cînd cromozomii sînt mai scurți și mai bine conturați. În acest stadiu, rupturile cromozomiale trebuie deosebite de *lacunele cromozomiale* care, la microscopia optică, apar sub forma unor arii necolorate (leziuni acromatice) în care materialul cromozomial nu este vizibil (fig. 12 a; fig. 12 b;

Scanned with OKEN Scanner

fig. 23 a). Prezența unei deplasări a segmentului cromozomial terminal permite afirmarea existenței unei rupturi. Natura lacunelor cromozomiale nu este cunoscută. Comings (11) consideră că ele ar reprezenta rupturi adevărate care însă nu se exteriorizează din cauza modului în care este pliată fibra de cromatină în decursul metafazei. Experiențele lui Brogger (4) sugerează însă că lacunele ar rezulta din afectarea componentei proteice a cromozomilor. Nu este exclus ca lacunele să aibă o natură dublă: unele să rezulte din afectarea proteinelor, iar altele din afectarea cromozomilor înșiși.

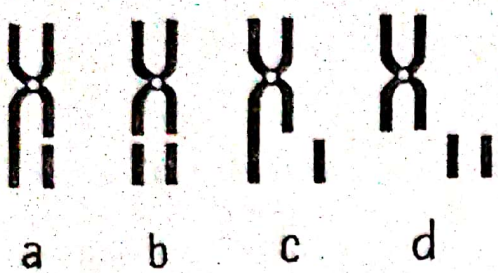


Fig. 12 — Reprezentare schematică a unui cromozom metafazic prezentînd:

a) lacună cromatidică; *b*) lacună cromozomică; *c*) ruptură cromatidică; *p*) ruptură cromozomică.

Examinarea metafazelor tratate cu metode de bandare a demonstrat că rupturile cromozomiale sînt localizate exclusiv la nivelul benzilor palide din preparatele colorate cu tehnicile Q sau G, care corespund benzilor întunecate din preparatele tratate după tehnica R (26, 55). Atît în cazul iradierii (6, 61, 62), cît și al substanțelor chimice (44, 51), unii cromozomi sînt afectați în mod preferențial și prezintă un număr mai mare de rupturi decît ar fi de așteptat luînd în considerare lungimea lor.

În timpul metafazei pot fi deosebite două tipuri de rupturi: cromatidice și cromozomiale (19). *Rupturile cromatidice* (fig. 12 c; fig. 23 b) interesează o singură cromatidă. Ele apar cînd celulele sînt expuse la acțiunea agenților mutageni în decursul fazei S sau G 2 a ciclului celular, deci după ce cromozomii s-au dedublat în două cromatide surori, ca urmare a replicării ADN-ului (leziuni post-reduplicative).

Rupturile cromozomice (fig. 12 d; fig. 23 c) sînt consecința acțiunii agenților mutageni asupra unor celule aflate în faza G_0 sau G_1, deci înaintea replicării ADN-ului (leziuni pre-reduplicative). După replicarea ADN-ului, leziunile sînt reproduse „în oglindă" pe ambele cromatide (11).

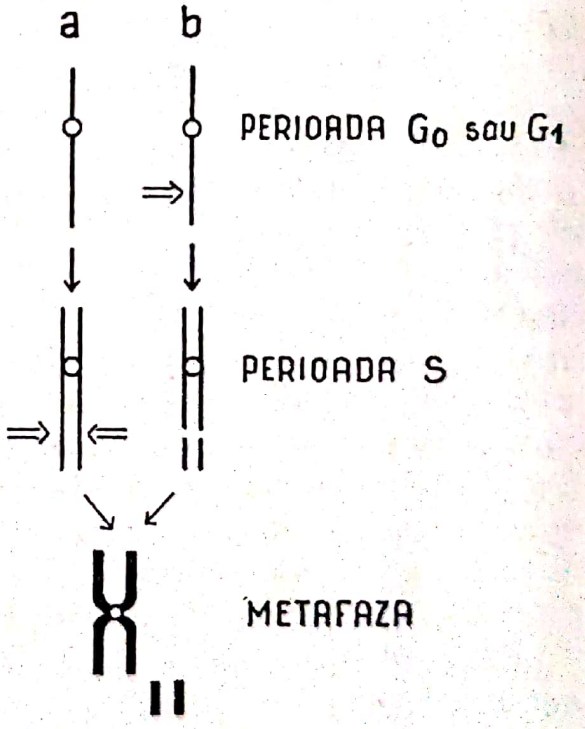


Fig. 13 — Mecanismul de apariție a rupturilor izocromatidice (*a*) și cromozomice (*b*).

Leziuni similare pot apărea însă și atunci cînd cele două cromatide ale unui cromozom devin din întîmpare țintă a două rupturi localizate la același nivel (rupturi izocromatidice) (fig. 13 a; fig. 13 b).

2.8.2.2. *Rearanjamentele cromozomice*

Rearanjamentele cromozomice sînt consecința rupturilor și a reunirilor care au loc în faza pre-reduplicativă (G0 și G1). Ele pot

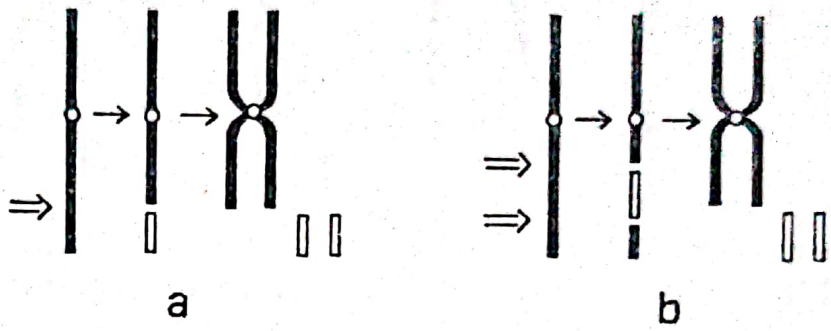


Fig. 14 — Mecanismul de apariție a deleției terminale (*a*) și interstițiale (*b*).

fi împărțite în două categorii: rearanjamente intracromozomice și rearanjamente intercromozomice.

A. *Rearanjamente intracromozomice*. Rearanjamentele intracromozomice interesează un singur cromozom. Ele pot implica prezența a 1, 2 sau 3 rupturi.

a) *Deleția* (fig. 14) constă în eliminarea unei porțiuni dintr-un cromozom. Prezența unei singure rupturi determină apariția unei deleții terminale. Delețiile interstițiale necesită existența a două rupturi, cu eliminarea segmentului intermediar și reunirea extremităților. Contrar așteptărilor, delețiile interstițiale sînt mai frecvente decît delețiile terminale, deoarece ele nu implică formarea unor noi telomere, necesare pentru stabilizarea delețiilor.

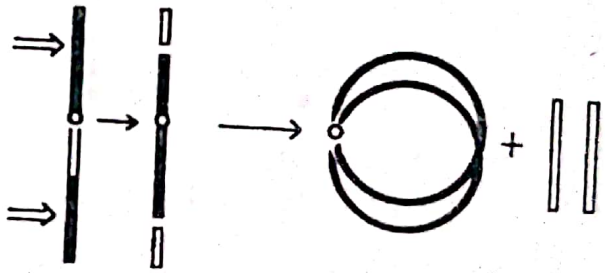


Fig. 15 — Mecanismul de formare a cromozomilor inelari.

b) *Cromozomii inelari* (fig. 15; fig. 23 d) sînt consecința existenței a două rupturi localizate la terminațiile celor două brațe ale cromozomului. Prin reunirea extremităților rupte se formează un cromozom inelar și două fragmente acentrice care vor fi pierdute.

c) *Inversiile* (fig. 16) sînt rearanjamente determinate de prezența a două rupturi. Înainte ca procesul de reunire să aibă loc, segmentul dintre cele două puncte de ruptură este rotat cu 180°. Cînd ambele rupturi sînt localizate pe același braț al cromozomului, inversia

Scanned with OKEN Scanner

este denumită *paracentrică*. Inversiile *pericentrice* includ și centromerul, deoarece punctele de ruptură sînt localizate de o parte și de cealaltă a centromerului. Inversiile paracentrice nu pot fi recunoscute cu ajutorul tehnicilor clasice de colorație, deoarece nu modifică forma cromozomului; ele pot fi însă identificate prin utlizarea metodelor de

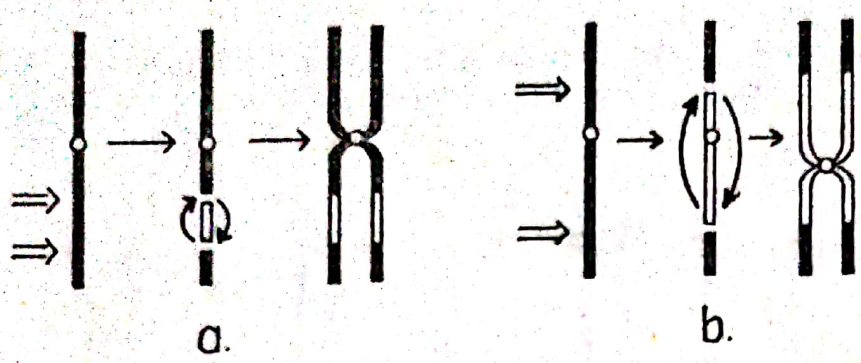


Fig. 16 — Mecanismul de apariție a inversiilor paracentrice (*a*) și pericentrice (*b*).

bandare. Inversiile pericentrice pot fi detectate și cu tehnicile uzuale, cînd rupturile sînt localizate la distanțe diferite de centromer, deoarece poziția centromerului se modifică.

d) *Deplasarea* (fig. 17) este rearanjament complex, condiționat de prezența a trei rupturi. Segmentul cromozomial situat între două puncte de ruptură este deplasat și inserat în spațiul creat de cea de a treia ruptură.

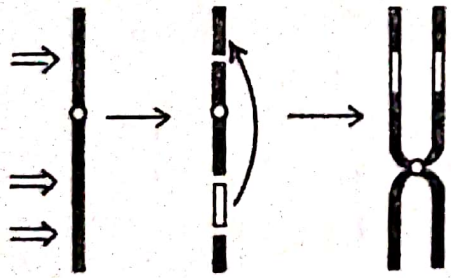


Fig. 17 — Mecanismul de apariție a deplasării.

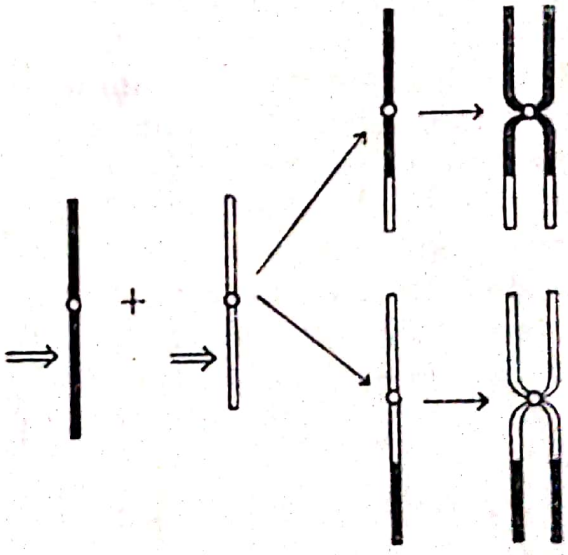


Fig. 18 — Mecanismul de apariție a translocației reciproce echilibrate.

B. *Rearanjamente intercromozomice*. Rearanjamentele intercromozomice (translocațiile) implică participarea a doi cromozomi neomologi.

a) În cazul *translocațiilor reciproce (interschimburi simetrice)* are loc un schimb mutual de segmente, rezultînd un complement cromozomial echilibrat (fig. 18). O altă posibilitate constă în reunirea părților centrice ale celor doi cromozomi, cu formarea unui *cromozom dicentric* și pierderea fragmentelor acentrice (fig. 19; fig. 23 e).

Scanned with OKEN Scanner

b) *Translocația nereciprocă (transpoziția, inserția)* este determinată de prezența a trei rupturi și constă în inserția unui segment cromozomial în regiunea interstițială a unui cromozom neomolog.

c) *Fuziunea centrică (translocația robertsoniană)* este o translocație reciprocă între doi cromozomi acrocentrici (fg. 20). Ea are drept

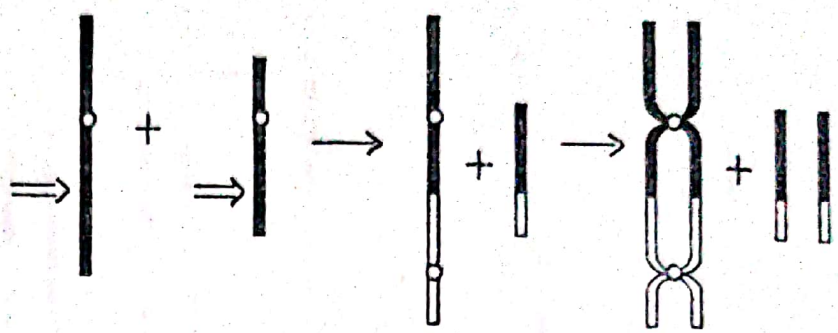


Fig. 19 — Mecanismul de formare a cromozomilor dicentrici.

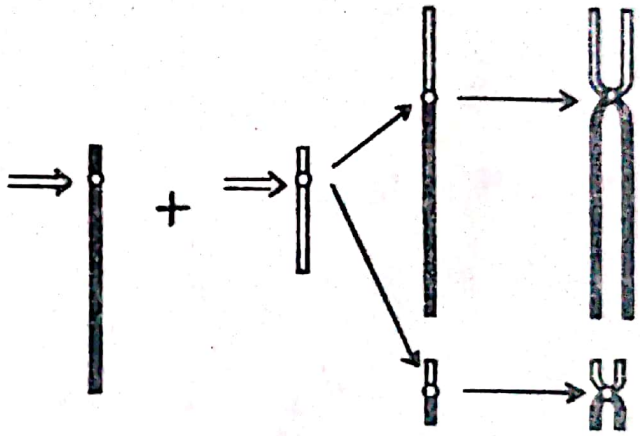


Fig. 20 — Mecanismul de apariție a fuziunii centrice (translocație robertsoniană).

rezultat apariția unui cromozom metacentric și a unui fragment centric (care este de obicei pierdut).

2.8.2.3. *Rearanjamentele cromatidice*

Aberațiile de tip cromatidic sînt consecința unor evenimente care au loc în faza post-reduplicativă (S și G2). Aceste rearanjamente sînt în esență similare cu cele de tip cromozomic. Gama rearanjamentelor intracromozomiale este însă mai largă, deoarece pot avea loc atît modificări intracromatidice, cît și intercromatidice. Ele includ deleții de tip terminal și interstițial, duplicații (inserția unui segment provenit dintr-o cromatidă în cealaltă cromatidă) (fig. 21) și inversii. Reunirea cromatidelor surori după ruptură poate duce la apariția unor configurații variate, inclusiv cromozomi dicentrici și fragmente acentrice.

Interschimburile între cromozomi diferiți realizează structuri cu aspect cvadriradial și sînt recunoscute cu ușurință în metafază (fig. 22; fig. 23 f).

Scanned with OKEN Scanner

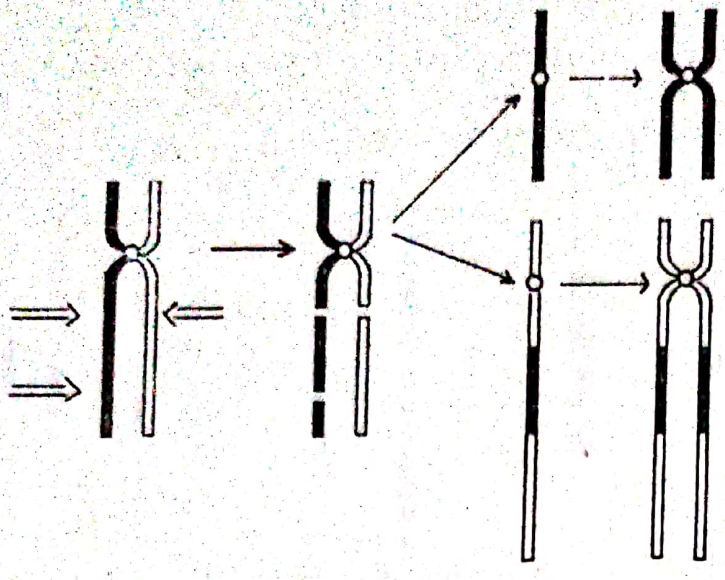


Fig. 21 — Mecanismul de apariție a duplicației.

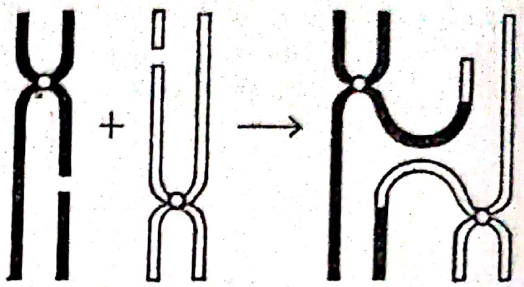


Fig. 22 — Mecanismul de apariție a interschimburilor.

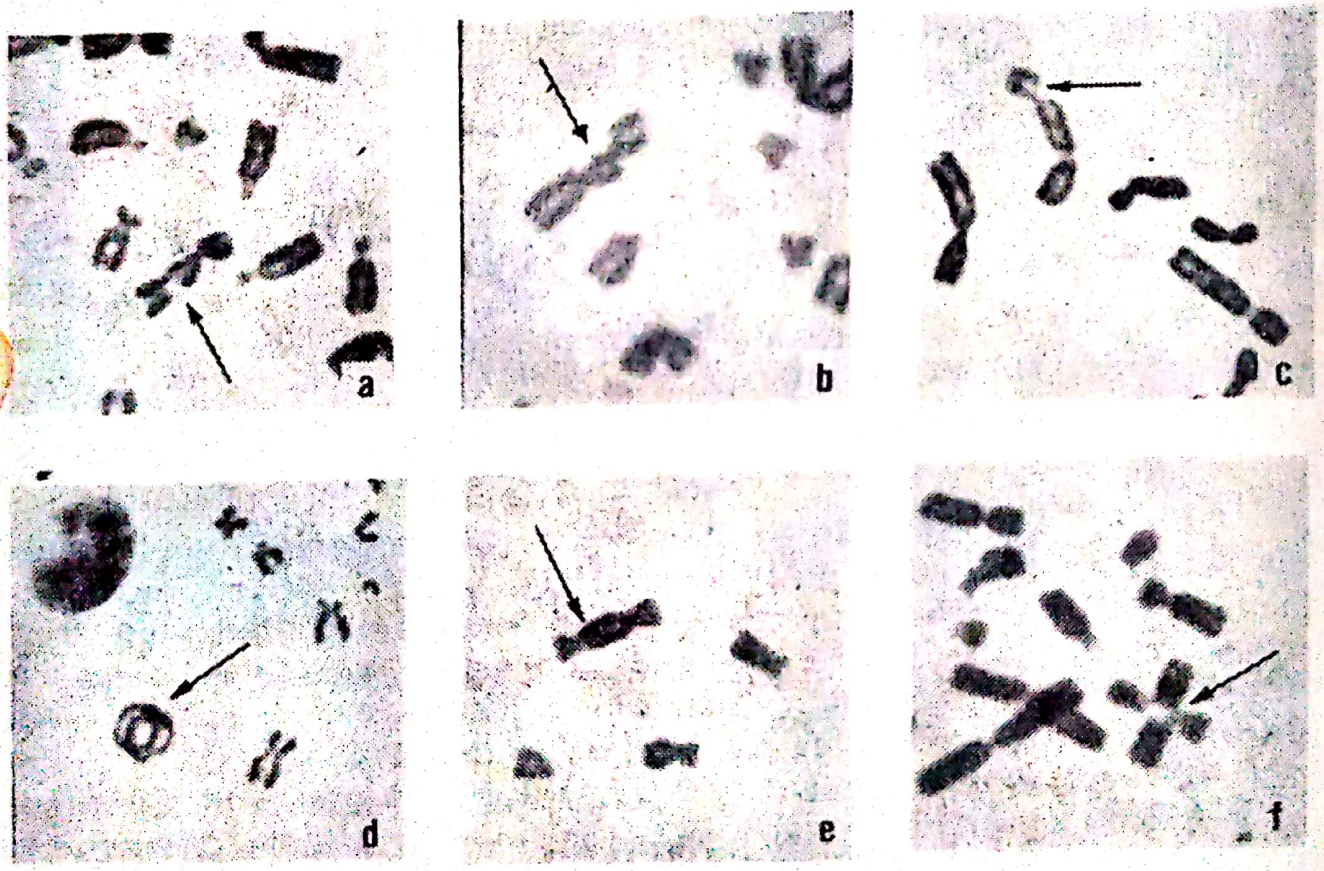


Fig. 23 — Montaj în care este reprezentat aspectul în metafază a unei lacune cromatidice (*a*), a unei rupturi cromatidice (*b*) și cromozomice (*c*), a unui cromozom inelar (*d*), a unui cromozom dicentric (*e*) și a unui interschimb (*f*).

Scanned with OKEN Scanner

2.8.2.4. *Diviziunea greşită a centromerului*

Diviziunea transversală a centromerului determină apariţia unui cromozom metacentric ale cărui braţe sint identice, denumit izocromozom (fig. 24).

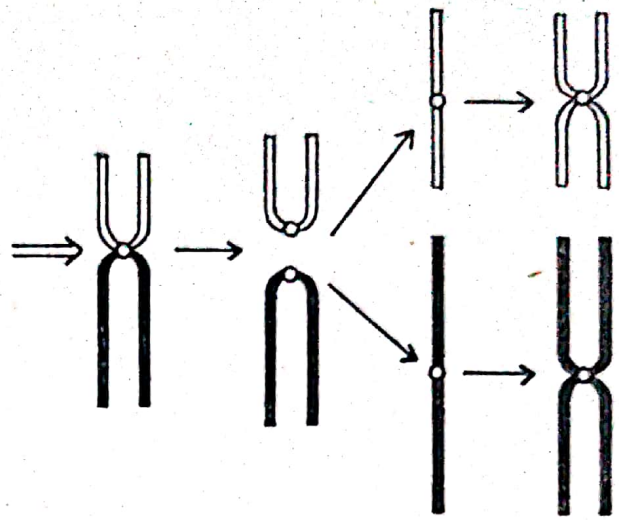


Fig. 24 — Mecanismul de formare a izocromozomilor.

2.9. Cromatina sexuală

2.9.1. Introducere

Termenul de cromatină sexuală defineşte un corpuscul prezent în nucleii celulelor, care indică sexul organismului din care derivă celulele.

Cromatina sexuală a fost descoperită în anul 1949 de către Barr şi Bertram (3), care în decursul unui studiu asupra neuronilor de pisică au observat că femelele prezentau un cromocentru specific, absent în nucleii masculilor. Ulterior, prezenţa unor corpusculi similari, denumiţi corpusculi Barr sau particule de cromatină sexuală, a fost observată şi în alte ţesuturi ale pisicii (muşchi, cartilaj, epidermă, endoteliu, epiteliul gastric, rinichi).

Introducerea cromatinei sexuale în citogenetica umană i se datoreşte lui Moore şi colab. (41), care au remarcat că cromatina sexuală poate fi identificată în biopsiile cutanate. Tehnica a fost ulterior simplificată de Moore şi Barr (40), care au arătat că celulele raclate din mucoasa bucală pot fi utilizate pentru determinarea cromatinei sexuale (fig. 25).

Scanned with OKEN Scanner

Un alt caracter determinat sexual a fost observat și în leucocitele polinucleare din sîngele periferic (12). În celulele provenite de la femei există un corpuscul cu diametrul de aproximativ 1,5 microni, atașat de nucleu printr-un filament subțire (fig. 26). Acest apendice nuclear, denumit „drumstick" (băț de tobă), lipsește din leucocitele bărbaților.

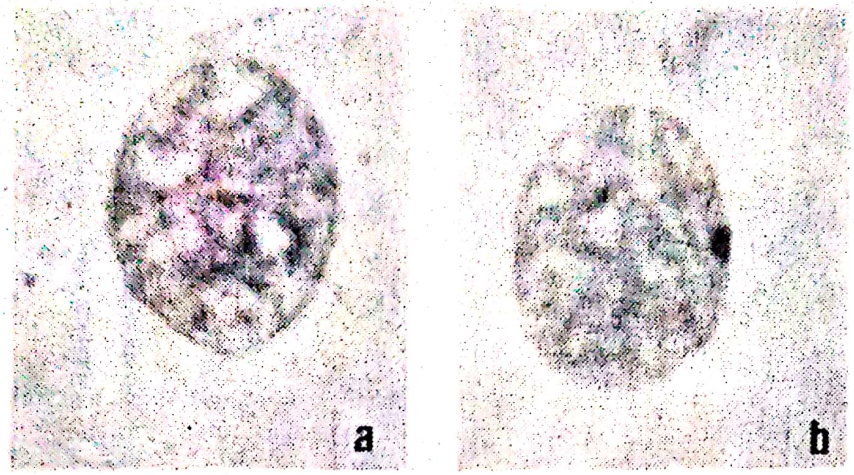


Fig. 25 — Celulă cromatino-negativă (*a*) și cromatino-pozitivă (*b*) într-un frotiu bucal.

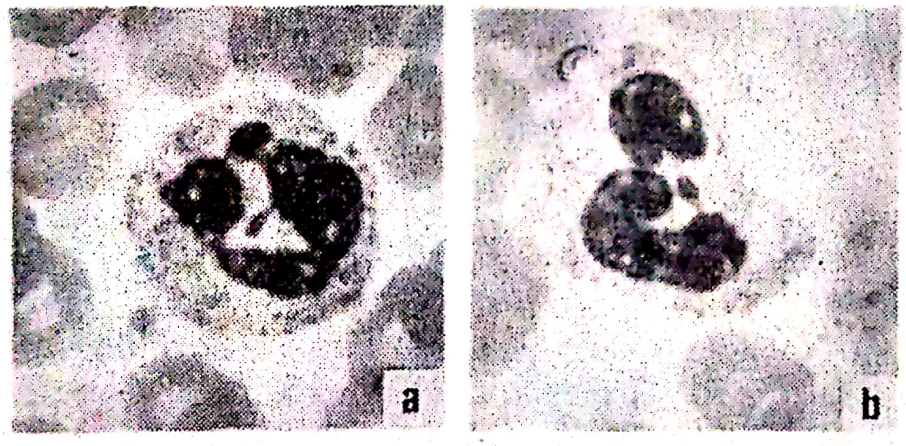


Fig. 26 — Apendici nucleari atașați de leucocite polinucleare.

2.9.2. Proprietățile generale ale cromatinei sexuale

a) *Frecvența.* Cromatina sexuală nu poate fi evidențiată în toate celulele de origine feminină. Frecvența nucleilor cromatino-pozitivi variază, în funcție de țesutul examinat, între 50 și 80%. Motivul pentru care unele celule feminine sînt cromatino-negative nu este

Scanned with OKEN Scanner

cunoscut. Întrucît între frecvența cromatinei sexuale și indicele mitotic există o relație inversă, s-ar putea ca particulele de cromatină sexuală să dispară din nucleii interfazici într-un anumit stadiu al sintezei de ADN premergătoare mitozei (38).

b) *Forma*. Particulele de cromatină sexuală au o formă variabilă; de obicei sînt plan-convexe, dar pot fi sferice, emisferice și triunghiulare.

c) *Dimensiunea* medie a corpusculilor Barr este de 0,7×1,2 microni.

d) *Poziția*. Corpusculii Barr sînt de obicei localizați la periferia nucleilor, fiind aplicați pe suprafața internă a membranei nucleare.

e) *Afinități tinctoriale*. Cromatina sexuală se colorează cu coloranți nucleari bazici cum sînt crezilul violet, tionina și hematoxilina. Faptul că particulele de cromatină sexuală se colorează cu tehnica Feulgen după hidroliză acidă și cu verde metil în reacția verde metil-pironină demonstrează că ele sînt constituite din ADN.

2.9.3. Originea cromatinei sexuale

La început se credea că particula de cromatină sexuală derivă din regiunile heterocromatice fuzionate ale celor doi cromozomi X (39). Ulterior, Ohno și colab. (45) au dovedit că particula de cromatină sexuală este formată dintr-un singur cromozom X, care se condensează în decursul interfazei. Celălalt cromozom X al femeilor rămîne destins ca, dealtfel, unicul cromozom X al bărbaților. Dovezile care susțin ipoteza derivării cromatinei sexuale dintr-un singur cromozom X pot fi sistematizate astfel:

a) Între numărul de particule de cromatină sexuală din celule și numărul de cromozomi X există o corelație exprimată prin formula:

$$B=x-1$$

unde B este numărul de corpusculi Barr, iar x este numărul de cromozomi X. Celulele provenite de la femei normale au doi cromozomi X și o particulă de cromatină sexuală. Celulele cu trei cromozomi X prezintă două particule de cromatină sexuală etc. Prezența cromozomului Y nu influențează numărul particulelor de cromatină sexuală, iar bărbații cu sindrom Klinefelter (47, XXY) au un corpuscul Barr în celule (fig. 27).

În celulele poliploide se adaugă cîte o particulă de cromatină

Scanned with OKEN Scanner

sexuală pentru fiecare set diploid suplimentar. Harnden (24) a exprimat această relație prin formula:

$$B = x - p\,2$$

unde B este numărul corpusculilor Barr, x este numărul cromozomilor X, iar p este gradul ploidiei. În celulele diploide, x=2, p=2, p/2=1, iar B=2–1; în celulele tetraploide, x=4, p=4, p/2=2, B=4–2.

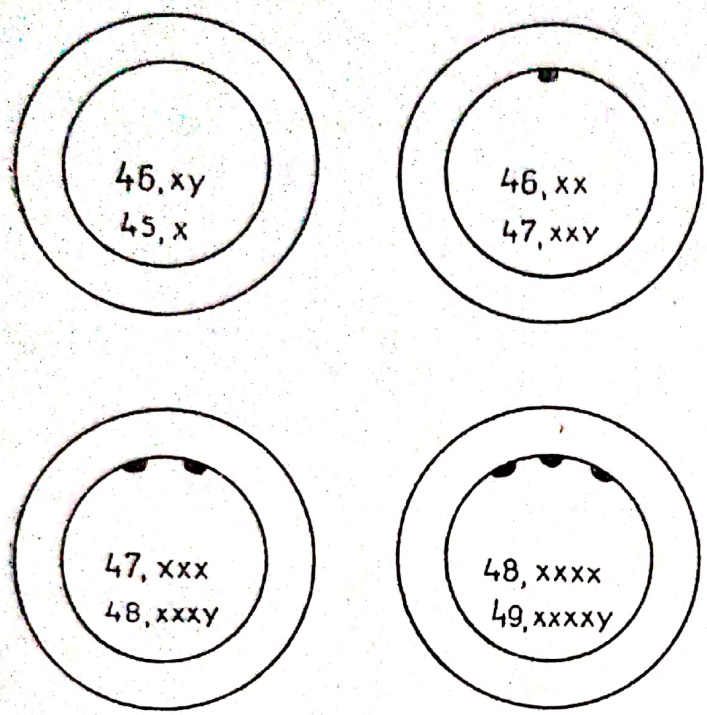


Fig. 27 — Relația dintre numărul cromozomilor X dintr-o celulă și numărul particulelor de cromatină sexuală.

b) Cercetările autoradiografice au demonstrat că unul din cromozomii X ai femeii își replică ADN-ul mai tardiv decît celălalt cromozom X. La femeile cu 3 cromozomi X, există 2 cromozomi X cu replicare tardivă, iar la femeile cu 4 cromozomi X, există 3 asemenea cromozomi. Numărul cromozomilor X cu replicare tardivă este deci identic cu numărul particulelor de cromatină sexuală, iar corpusculii Barr derivă de fapt din acești cromozomi.

2.9.4. Cromatina sexuală și inactivarea genică

Müller (42) a observat că efectul genelor localizate pe cromozomul X al Drosophilei este egal la masculi (unde ele apar într-o singură doză) și la femele (unde există două doze) și a denumit acest fenomen „compensare a dozajului". Ulterior s-a demonstrat că fenomenul de compensare a dozajului operează și la mamifere. La om, de exemplu, gena care controlează sinteza glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (G-6-PD) este localizată pe cromozomul X. Cantitatea de G-6-PD este totuși identică la bărbați și la femei. Tot pe cromozomul X sînt localizate gene care produc enzime cu rol în coagularea sîngelui (globulina antihemofilică, protromboplastina). Nivelul ambilor produși este similar la bărbați și la femei (66).

Scanned with OKEN Scanner

Bazată pe aceste date, precum și pe rezultatele unor experiențe asupra determinismului culorii blănii la șoareci, Lyon (35–37) a formulat ipoteza că genele de pe un cromozom X sînt inactive. Regiunile cromozomiale inactive au și alte proprietăți, printre care calitatea de replicare tardivă în timpul fazei S și heteropicnoza în decursul interfazei și profazei (care reprezintă substratul morfologic al cromatinei sexuale).

Inactivarea genelor de pe unul din cromozomii X are loc în timpul perioadei embrionare. Procesul de inactivare inițială interesează, la întîmplare, cromozomul X de origine maternă în unele celule și cromozomul X de origne paternă în alte celule. După ce decizia asupra inactivării a fost luată, ea rămîne însă definitivă, iar celulele în care a fost inactivat cromozomul X de origine maternă vor da naștere unor clone de celule în care cromozomul X matern este inactivat, în timp ce celulele în care a fost inactivat cromozomul X de origine paternă formează clone de celule cu cromozomul X patern inactiv. Din acest punct de vedere, organismul femeilor este un mozaic.

2.9.5. Cromatina sexuală în tumori

Identificarea cromatinei sexuale în celulele tumorale este adesea dificilă, deoarece nucleii interfazici tumorali prezintă cromocentri multipli, uneori de dimensiuni mari, derivați din heteropicnoza unor cromozomi somatici, care pot fi confundați cu corpusculii Barr. Din acest motiv, este necesară adoptarea unor criterii rigide de definire a cromatinei sexuale. Cu aceste precauții, studiul cromatinei sexuale poate aduce informații prețioase asupra modificărilor cromozomilor sexuali în tumori.

2.10. **Nomenclatura utilizată în citogenetică**

Pentru a se putea efectua schimbul de informații între diferite grupe de cercetători, a devenit necesară adoptarea unui limbaj comun. Sistemul standard de nomenclatură, acceptat astăzi pe plan internațional, este rezultatul discuțiilor care au avut loc la Denver în 1960 (14), la Londra în 1963 (34), la Chicago în 1966 (9) și la Paris în 1971 (47).

In cele ce urmează, redăm principalele simboluri utilizate în citogenetica umană, pentru a facilita consultarea literaturii de specialitate.

Scanned with OKEN Scanner

2.10.1. Cariotipul normal și aberațiile cromozomiale numerice

Cariotipul este descris notînd numărul total de cromozomi, urmat de specificarea cromozomilor sexuali, de exemplu:

46,XX sau 46, XY=cariotip normal feminin sau masculin.

47,XXY=47 cromozomi, cromozomii sexuali fiind XXY.

Autozomii sînt specificați numai atunci cînd sînt implicați în modificări numerice. În acest caz, simbolul cromozomului suplimentar sau lipsă este precedat de semnul plus (+) sau minus (—); de exemplu:

47,XX,+9=femeie, cu un cromozom suplimentar nr. 9;

45,XX,—C=femeie, cu un cromozom absent în grupa C, care nu a putut fi identificat cu precizie.

Semnul întrebării (?) indică incertitudinea. Cînd se suspectează că într-o celulă cu 47 de cromozomi, cromozomul suplimentar aparține perechii 21, dar acest fapt nu este cert, se notează:

47,XX,?+21

Metafazele *endoreduplicate* se indică prin prescurtarea end, care precede desemnarea cariotipului; de exemplu:

end 46,XX

Prezența unui *mozaic cromozomial* se notează menționînd cariotipurile liniilor celulare, separate printr-o diagonală (/); de exemplu:

46,XX/47,XX,+21=mozaic cromozomial constînd dintr-o linie celulară feminină și o linie cu un cromozom suplimentar nr. 21.

2.10.2. Modificări structurale ale cromozomilor

Brațul scurt al unui cromozom este desemnat cu litera „p", *brațul lung* cu litera „q", *sateliții* cu litera „s", o *constricție secundară* cu litera „h" iar *centromerul* cu prescurtarea „cen".

Creșterea sau scăderea lungimii brațului unui cromozom sînt menționate plasînd semnul plus (+) sau minus (—) după simbolul care desemnează brațul cromozomial implicat; de exemplu:

46,XX,2q+=femeie, cu 46 de cromozomi, cu o creștere a dimensiunii brațului lung al unui cromozom nr. 2.

46,XX,20p—=femeie, cu 46 de cromozomi, cu o scădere a dimensiunii brațului scurt al unui cromozom nr. 20.

Creșterea sau scăderea lungimii constricțiilor secundare este menționată plasînd simbolul „h" între simbolul brațului și semnul (+) sau (—); de exemplu:

Scanned with OKEN Scanner

46,XX,16qh+=femeie, cu 46 de cromozomi, prezentînd o creștere a dimensiunii constricției secundare de pe brațul lung al unui cromozom nr. 16.

Cromozomii inelari se notează cu litera „r" plasată înaintea cromozomului implicat; de exemplu:

46,XX,r(18)=femeie, cu 46 de cromozomi, care prezintă un cromozom inelar nr. 18.

Izocromozomii se desemnează cu litera „i" plasată înaintea brațului cromozomial implicat; de exemplu:

46,X,i(Xq)=femeie, cu 46 de cromozomi, incluzînd un cromozom X normal și un izocromozom pentru brațul lung al unui cromozom X.

Cromozomii *dicentrici* și *tricentrici* sînt desemnați cu prescurtările „dic" și „tri"; de exemplu:

46,X,dic(Y)=bărbat, cu 46 de cromozomi, incluzînd un cromozom X și un cromozom Y dicentric.

Translocațiile sînt desemnate plasînd litera „t" înaintea cromozomilor implicați.

În cazul *translocațiilor reciproce echilibrate* se menționează cromozomii normali implicați în translocație; de exemplu:

46,XX,t(4p−; 13q+)=translocație echilibrată între brațul scurt al unui cromozom nr. 4 (care este scurtat) și brațul lung al unui cromozom nr. 13 (care este alungit). Acest tip de translocație poate fi desemnat și scriind „rcp" (reciproc) în loc de t, adică: 46,XXrcp(4p—; 13q+).

O *translocație reciprocă neechilibrată* de acest tip s-ar scrie: 46,XX,—4,+t(13q+; 4p−)

Această formulă indică absența unui cromozom nr. 4, care a fost înlocuit cu un cromozom ce constă dintr-un cromozom nr. 13 al cărui braț lung are dimensiuni crescute, ca urmare a translocației brațului scurt al unui cromozom nr. 4.

Translocațiile robertsoniene (fuziunile centrice) sînt desemnate menționînd cromozomii implicați; de exemplu: 46,XX,t(13q;15q). În acest tip de translocație, simbolul „t" poate fi înlocuit cu simbolul „rob": rob(13q; 15q).

În cazul *inversiilor pericentrice* se menționează modificările de dimensiuni ale brațelor; de exemplu:

46,XX,inv(5p+q—)=inversie pericentrică a cromozomului 5, a cărei consecință este creșterea dimensiunii brațului scurt și scăderea dimensiunii brațului lung.

Scanned with OKEN Scanner

Cromozomii a căror origine nu poate fi identificată sînt denumiți *markeri* și se notează „mar". *Fragmentele acentrice* nu sînt incluse în numărătoarea cromozomilor, dar sînt menționate cu prescurtarea „ace".

2.10.3. Nomenclatura benzilor cromozomiale

Apariția tehnicilor de bandare a cromozomilor a determinat introducerea unor termeni noi. Conform sistemului de nomen-

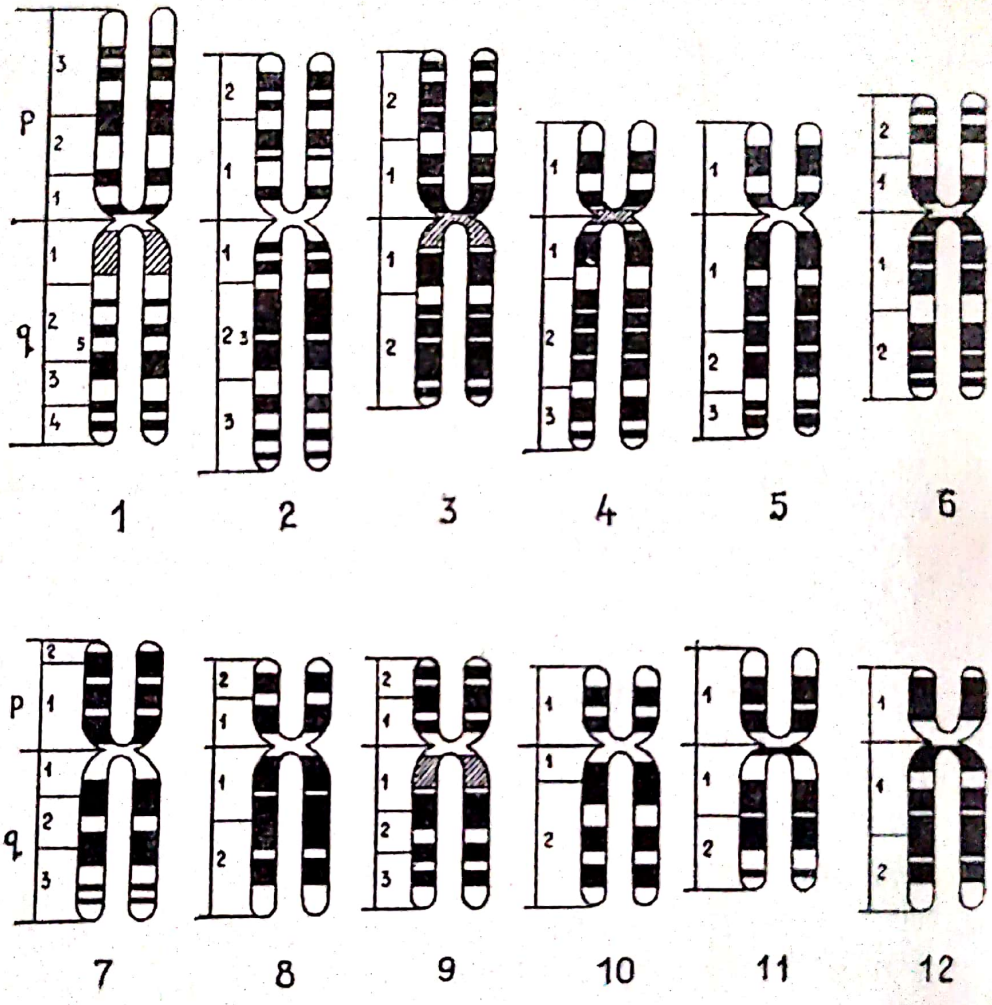


Fig. 28 — Nomenclatura benzilor cromozomiale, adoptată la conferința asupra standardizării în citogenetica umană de la Paris (47).

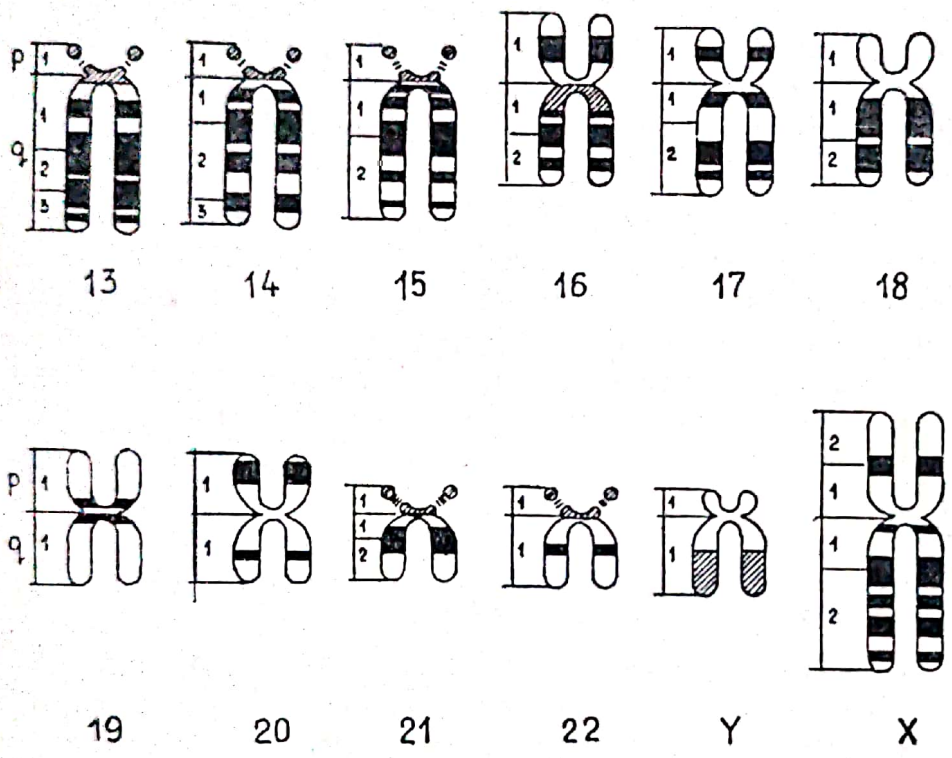
clatură adoptat la Paris (47), fiecare cromozom uman constă dintr-o serie continuă de benzi. Prin *bandă cromozomială* se înțelege o parte a unui cromozom, care se deosebește de segmentele adiacente printr-o colorație mai intensă sau mai palidă. *Jaloanele cromozomiale* sînt definite ca trăsături morfologice constante și distinctive, importante pentru identificarea cromozomilor. Aceste jaloane sînt reprezentate de terminațiile brațelor cromozomiale, centromere și

Scanned with OKEN Scanner

anumite benzi. *Regiunile* sînt arii cromozomiale dispuse între două jaloane adiacente. Atît regiunile, cît și benzile, sînt numerotate dinspre centromer spre extremitățile brațelor cromozomilor.

Pentru a desemna o anumită bandă, se menționează în ordine numărul cromozomului, simbolul brațului, numărul regiunii și numărul benzii din regiune. De exemplu, 1q25 indică cromozomul 1, brațul lung, regiunea 2, banda 5 (fig. 28).

Utilizarea acestui sistem de nomenclatură permite precizarea punctelor de ruptură care stau la originea unor anomalii. De exemplu, 46,XX,del(2)(q23) indică o ruptură la nivelul benzii 2q23 și dele-



= BENZI G ȘI Q NEGATIVE SAU COLORATE PALID
BENZI R POZITIVE

= BENZI Q SAU G POZITIVE
BENZI R NEGATIVE

= BENZI VARIABILE

ția segmentului situat distal. Restul cromozomului constă din brațul scurt al cromozomului nr. 2 și partea din brațul lung dispusă între centromer și banda 2q23.

Cu ajutorul benzilor cromozomiale se poate preciza natura unei deleții (terminală sau interstițială), prezența unei inversii paracentrice și se pot identifica segmentele cromozomiale implicate în rearanjamente complexe.

Scanned with OKEN Scanner

2.11. Determinarea citochimică a cantității de ADN din nuclei

În decursul ultimelor două decenii au fost puse la punct metode care permit determinarea cantității în care se găsesc diferitele substanțe chimice care intră în constituția celulelor. Aceste metode se bazează pe proprietatea constituenților celulari de a lega în mod specific și cantitativ (stoichiometric) anumiți coloranți. Dacă prin celule trec unde electromagnetice cu o anumită lungime, are loc o interacțiune a cromoforilor cu fotonii. Rezultatul acestei interacțiuni este o pierdere de energie sau absorbție a luminii, care poate fi apreciată cu ajutorul unui fotometru combinat cu un microscop. Întrucît cantitatea de lumină absorbită este proporțională cu numărul cromoforilor prezenți, se poate determina masa substanței respective.

În cazul acidului dezoxiribonucleic (ADN) se utilizează colorația Feulgen (13, 32, 43) sau colorația cu galocianină (54), iar preparatele sînt examinate în lumină vizibilă la o lungime de undă care corespunde absorbției maxime pentru reacția respectivă. O altă posibilitate este reprezentată de utilizarea unor fluorocromi bazici care reacționează cu ADN, urmată de examinare în lumină ultravioletă. În acest caz, lumina fluorescentă emisă de celule este proporțională cu cantitatea de ADN (52).

Deoarece ADN-ul nuclear este localizat în cromozomi, determinarea cantității de ADN ar putea da informații asupra numărului de cromozomi din celule. Această supoziție a fost verificată de Atkin și colab. (2), care au studiat comparativ numărul de cromozomi și cantitatea de ADN din nucleii unui număr apreciabil de tumori umane și au observat existența unei corelații între cei doi parametri.

În comparație cu analiza cromozomială, determinările microspectrofotometrice au atît avantaje, cît și dezavantaje. Principalul merit al metodei microspectrofotometrice constă în faptul că ea poate fi aplicată cu succes pe orice material, în timp ce reușita examenului cromozomial este condiționată de existența unui indice mitotic ridicat și este influențată de factori încă insuficient cunoscuți. Tehnica microspectrofotometrică poate fi utilizată pentru examinarea biopsiilor tratate cu procedeele întrebuințate de rutină în laboratoarele de anatomie patologică și permite corelarea datelor de citochimie cantitativă cu aspectul histopatologic al tumorilor. În sfîrșit, microspectrofotometrele moderne permit evaluarea rapidă a probelor, în timp ce analizele cromozomiale sînt extrem de laborioase și necesită un volum mare de muncă.

Scanned with OKEN Scanner

Dezavantajul microspectrofotometriei constă în sensibilitatea sa redusă. Lipsa unui cromozom dintr-o celulă nu poate fi detectată, iar rearanjamentele structurale ale cromozomilor cu conservarea cantităţii de ADN sînt omise în totalitate.

Rezultatele obţinute prin metodele microspectrofotometrice se exprimă în valori relative. Din acest motiv, valorile referitoare la con-

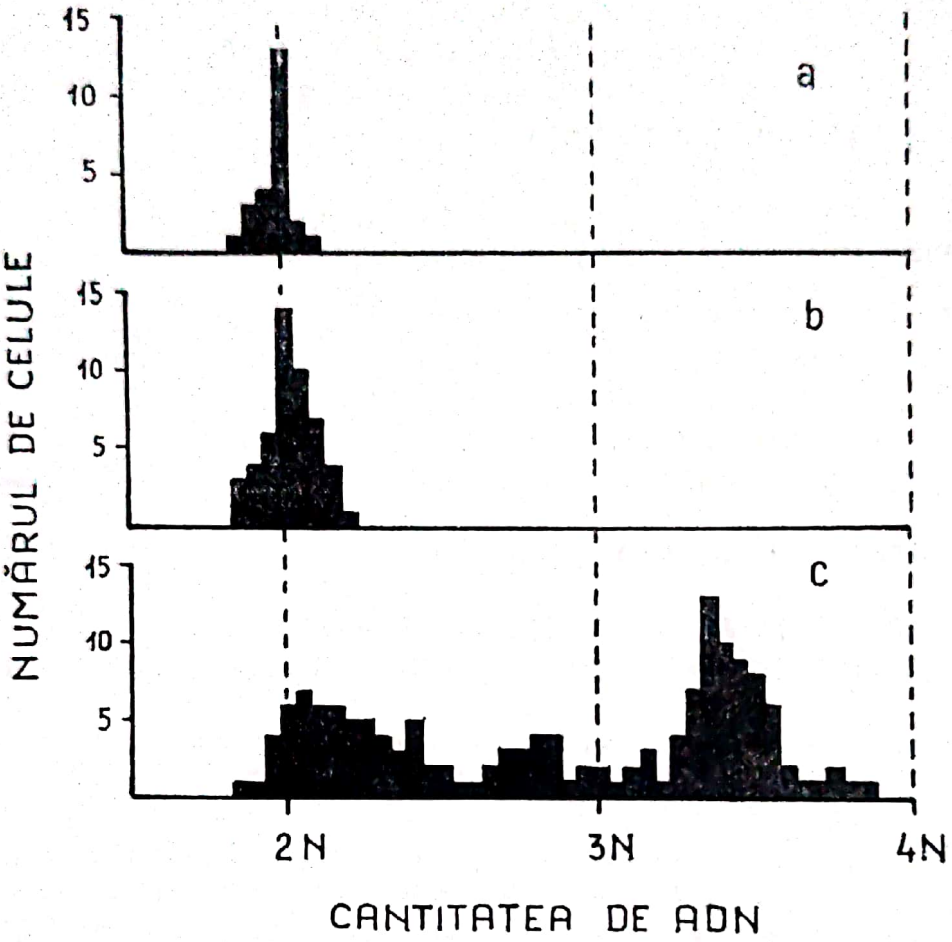


Fig. 29 — Conţinutul în ADN al nucleilor din celulele epiteliului cervical normal (*a*), dintr-o displazie agravată (*b*) şi dintr-un carcinom invaziv (*c*).

ţinutul în ADN al celulelor tumorale sînt comparate cu valorile corespunzătoare limfocitelor sau fibroblastelor. Aceste celule au cantităţi normale, diploide (2n) de ADN şi sînt prezente în majoritatea secţiunilor sau amprentelor de tumori. După determinarea cantităţii de ADN dintr-un număr reprezentativ de celule, se reprezintă grafic valorile, rezultînd o *histogramă*.

În celulele tumorilor benigne se observă valori normale ale ADN, în timp ce în tumorile maligne conţinutul în ADN este aneuploid (fig. 29). Celulele dintr-o anumită tumoare prezintă cantităţi asemă-

Scanned with OKEN Scanner

nătoare de ADN, care se grupează de obicei în jurul unei anumite valori, denumite *linie sușă ADN* sau *număr modal* (53).

Determinările microspectrofotometrice au fost utilizate în studii referitoare la mecanismele carcinogenezei. Atît cercetările asupra transformării maligne a celulelor menținute *in vitro*, cît și investigațiile asupra populațiilor celulare caracteristice unei anumite etape din procesul de cancerizare *in vivo* au demonstrat că momentul transformării maligne coincide cu apariția unor linii celulare aneuploide (53). Alte aplicații – diagnosticul leziunilor considerate histopatologic „de limită" și aprecierea prognosticului bolnavilor – vor fi expuse în capitolele următoare.

BIBLIOGRAFIE

1. ARRIGHI F. E., HSU T. C. — *Cytogenetics*, 1971, *10*, 81.
2. ATKIN N. B., MATTINSON G., BAKER M. C. — *Brit. J. Cancer*, 1966, *20*, 87.
3. BARR M. L., BERTRAM E. G. — *Nature (Lond.)*, 1949, *163*, 676.
4. BROGGER A. — *Hereditas*, 1975, *80*, 131.
5. CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G. E. și colab. — *Exp. Cell. Res.*, 1968, *49*, 219.
6. CASPERSSON T., HAGLUND U., LINDELL B., ZECH L. — *Exp. Cell. Res.*, 1972, *75*, 541.
7. CASPERSSON T., ZECH L., MODEST E. J. și colab. — *Exp. Cell Res.*, 1969, *58*, 141.
8. CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., MODEST E. J. — *Chromosoma*, 1970, *30*, 215.
9. *** — Standardization in human cytogenetics, Birth defects, Chicago Conference, Original Article series, 1966, *2*, 3—11, The National Foundation, New York.
10. COMINGS D. A. — *Ann. Rev. Genet.*, 1974, *7*, 44.
11. COMINGS D. A. — in: Chromosomes and cancer (sub red. J. German), John Wiley and Sons, New York-Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 95.
12. DAVIDSON R. G., SMITH R. D. — *Brit. med. J.*, 1954, *ii*, 6.
13. DEITCH A. D. — in: Introduction to quantitative cytochemistry (sub red. G. L. Wied), Academic Press, New York-Londra, 1966, p. 327.
14. DENVER REPORT — *Lancet*, 1960, *i*, 1 063.
15. DRETS M. E., SHAW M. W. — *Proc. Nat. Acad. Sci (Wash.)*, 1971, *68*, 2 073.
16. DUTRILLAUX B. — *Chromosoma*, 1973, *41*, 395.
17. DUTRILLAUX B., DE GROUCHY J., FINAZ C., LEJEUNE J. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1971, *273*, 587.
18. DUTRILLAUX B., LEJEUNE J. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1971, *272*, 2 638.
19. EVANS H. J. — in: Chromosomes and cancer (sub red. J. German), John Wiley and Sons, New York-Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 191.
20. FERGUSSON-SMITH M. A., HANDMAKER S. D. — *Ann. hum. Genet.*, 1963, *27*, 143
21. FORD E. H. R. — Human chromosomes, Academic Press, Londra-New York, 1973, 9.

Scanned with OKEN Scanner

3. CICLUL CELULAR ÎN TUMORI

3.1. Introducere

Datele referitoare la *mecanismele* care controlează activitatea proliferativă a celulelor sînt încă limitate. Cunoştinţele acumulate în ultimele două decenii au permis totuşi o apreciere destul de exactă a *parametrilor cinetici* ai celulelor normale şi tumorale. Pentru a înţelege ce progrese au fost făcute în acest domeniu este suficient să reamintim faptul că în anul 1955, într-un capitol de 12 pagini dedicat diviziunii celulare, Cowdry (31) a putut condensa cunoştinţele existente asupra interfazei în mai puţin de 6 rînduri.

Înainte de a aborda problemele cineticii tumorale este necesară precizarea unor noţiuni fundamentale, care caracterizează activitatea proliferativă a sistemelor celulare.

3.2. Ciclul celular în ţesuturile normale

3.2.1. Generalităţi

Ciclul celular al unei celule cuprinde perioada dintre formarea celulei respective prin diviziunea celulei mamă şi momentul cînd celula se divide la rîndul ei, pentru a genera două celule fiice. Cea mai mare parte a ciclului celular este ocupată de interfază, etapă în care au loc activităţi sintetice care, în esenţă, duc la dublarea componentelor celulare. Mitoza este caracterizată prin procese de clivare şi separare spaţială a componentelor celulare.

Există două categorii de *metode de studiere a ciclului celular* (97):

a) *Determinări pe celule vii*

1. Microcinematografia în contrast de fază reprezintă singura metodă care permite determinarea exactă a duratei mitozei, precum şi a intervalului de timp dintre două mitoze consecutive.

Scanned with OKEN Scanner

2. Calcularea numărului de celule, metodă utilizabilă mai ales în culturi de țesuturi și în tumori ascitice, permite determinarea timpului necesar pentru dublarea populației celulare respective.

3. Volumul celular și greutatea uscată a celulelor reprezintă indici de creștere care evoluează paralel cu masa celulară.

b) *Studiul celulelor fixate*

1. Metodele citochimice cantitative permit determinarea cantității de ADN din nuclei. Aplicată la o populație celulară asincronă, citofotometria arată prezența a trei categorii de nuclei interfazici: un prim vîrf, corespunzător celulelor cu un conținut postmitotic de ADN, este constituit din celule cu valori diploide ale ADN. Un al doilea vîrf este alcătuit din celule aflate în faza premitotică, care au valori duble (tetraploide) de ADN. Alte celule, în care procesul de sinteză a ADN este în desfășurare, prezintă valori intermediare ale ADN (fig. 30).

Metodele microspectrofotometrice au demonstrat că sinteza de ADN ocupă numai o perioadă limitată din interfază. Ele nu pot preciza însă nici începutul, nici sfîrșitul acestei etape.

2. Majoritatea cunoștințelor noastre asupra ciclului celular se datorează utilizării autoradiografiei. Pornind de la considerente care au fost prezentate în capitolul anterior, s-a propus utilizarea timidinei marcate cu tritiu (timidină-H^3) pentru studiul sintezei ADN. Întrucît ADN este stabil, soarta unei celule marcate și a descendentelor ei poate fi urmărită în timp; concentrația izotopului se reduce, desigur, la jumătate cu fiecare diviziune celulară (6, 7).

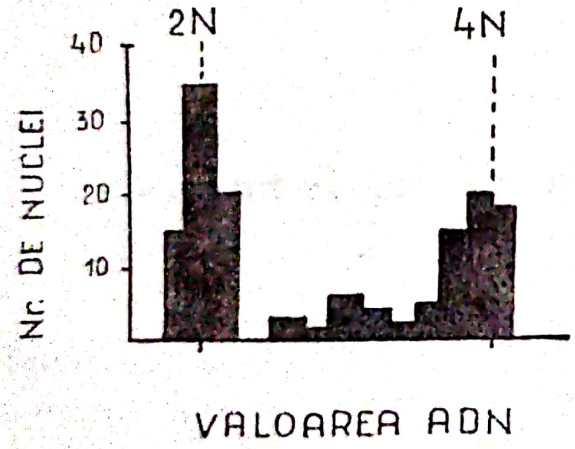


Fig. 30 — Distribuția valorilor ADN nuclear într-o populație celulară asincronă.

Modelul fundamental al desfășurării ciclului celular a fost imaginat de Howard și Pelc (61). Conform acestui model, sinteza ADN are loc într-o perioadă limitată a ciclului celular (faza S). Sinteza ADN se oprește cu cîteva ore înainte de debutul mitozei. Această perioadă, interpusă între completarea sintezei și mitoză (M) este denumită fază postsintetică sau G2 (de la cuvîntul englez „gap" care înseamnă interval, gol). O altă perioadă cînd procesul de sinteză a ADN este oprit (faza G1) se interpune între sfîrșitul mitozei și începutul fazei S. Ciclul celular poate fi astfel împărțit în 4 faze principale: G1, S, G2 și M (fig. 1).

Scanned with OKEN Scanner

3.2.2. Determinarea duratei fazelor ciclului celular

O estimare precisă a duratei fiecărei faze și implicit a ciclului celular poate fi făcută cu ajutorul *curbei mitozelor marcate*, al cărei principiu a fost expus de Quastler și Sherman (113). Metoda constă în injectarea unor animale sau tratarea unor culturi cu timidină tritiată. La anumite intervale după injectare se prelevează eșantioane dintr-un țesut sau se sacrifică culturi care sînt apoi prelucrate autoradiografic și se calculează procentul de mitoze marcate, care sînt reprezentate grafic în funcție de timp (fig. 31).

În primele 1–2 ore, mitozele nu sînt marcate, sinteza de ADN fiind oprită atît în decursul mitozei, cît și în faza G2. După acest interval apare o primă undă de mitoze marcate, derivate din celulele care în momentul administrării timidinei-H^3 se aflau în faza S. Procentul de mitoze marcate crește apoi rapid, atingînd sau apropiindu-se de 100. După o perioadă de platou, curba mitozelor marcate înregistrează un traiect descendent, apropiindu-se de 0. Ur-

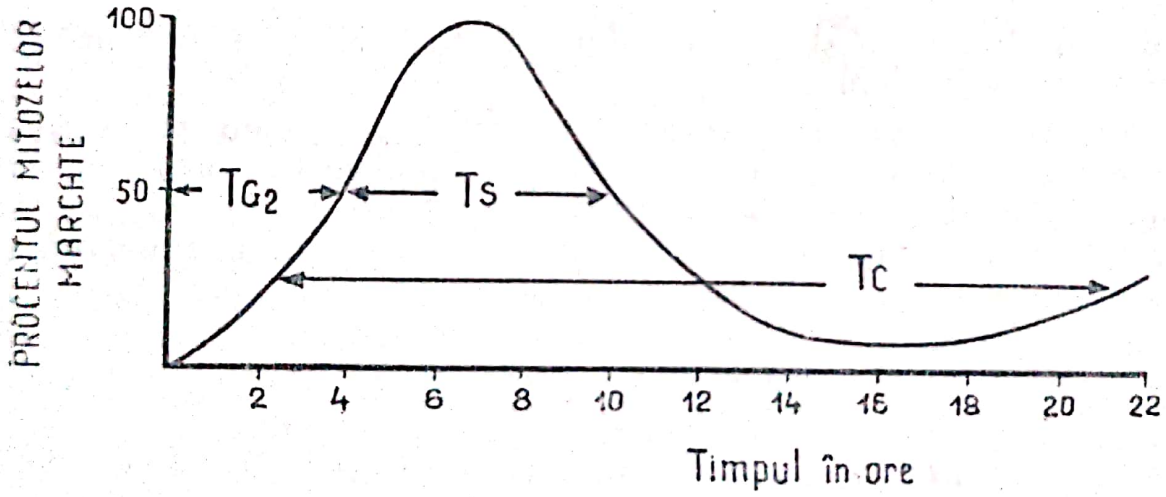


Fig. 31 — Determinarea duratei fazelor ciclului celular cu ajutorul curbei mitozelor marcate.

mează o nouă undă de mitoze marcate, derivate din acele celule care intraseră în mitoză în decursul primelor ore după expunerea la timidină (6, 7).

Lungimea ciclului celular (T_C) se obține măsurînd intervalul de timp dintre două puncte corespondente de pe ramurile ascendente ale celor două unde mitotice. Durata fazei premitotice (T_{G_2}) corespunde intervalului de timp dintre injectarea timidinei-H^3 și punctul

în care 50% din mitoze sînt marcate pe ramura ascendentă a primei unde mitotice. Durata fazei de sinteză (T_S) este reprezentată de intervalul de timp dintre punctele care corespund la 50% mitoze marcate, pe ramura ascendentă și descendentă a primei unde mitotice.

O metodă utilă pentru determinarea fazei S la animale este *metoda dublei marcări*. Ea constă dintr-o marcare inițială cu timidină-H^3 urmată după o perioadă T_a – egală sau mai scurtă decît durata fazei G2 – de o marcare cu timidină-C^{14}. Celulele marcate cu timidină tritiată (N_{H^3}) pot fi deosebite autoradiografic de celulele marcate cu C^{14} ($N_{C^{14}}$). Durata fazei S este obținută din ecuația:

$$N_{H^3}/N_{C^{14}} = T_a / T_S$$

O variantă elegantă a acestei metode, aplicabilă și la om, constă în expunerea *in vivo* la timidină-H^3 urmată de prelevarea țesutului și marcare cu timidină-C^{14} (78).

Determinarea fazei S conform metodei expuse, permite calcularea duratei ciclului celular prin rezolvarea ecuației:

$$N_S/N_C = T_S/T_C$$

unde N_S = numărul de celule aflate în faza S, iar N_C = numărul de celule aflate în ciclu.

Această relație este valabilă numai atunci cînd toate celulele sistemului celular studiat participă la procesul proliferativ, adică atunci cînd $N_C = N_T$ (N_T = numărul total de celule) (7). În cazul unei fracțiuni proliferative scăzute, ecuația trebuie corectată, devenind:

$$\frac{N_S}{(N_C/N_T)\,N_T} = \frac{T_S}{T_C}$$

Durata mitozei poate fi calculată din relația:

$$T_M/T_C = N_M/N_C$$

unde N_M = numărul de celule în mitoză. Întrucît $N_M/N_C \times 1000$ reprezintă indicele mitotic (I.M.), durata mitozei poate fi obținută ușor, după calcularea duratei ciclului celular și a indicelui mitotic. O corecție a ecuației, propusă de Stanner și Till (134), este necesară în cazul populațiilor în creștere exponențială:

$$T_M = \frac{(N_M/N_C)T_C}{0{,}693}$$

Scanned with OKEN Scanner

Durata fazei presintetice (T_{G1}) se obține din formula:

$$T_{G1} = T_C - (T_{G2} + T_S + T_M)$$

după determinarea duratei ciclului celular și a celorlalte componente ale sale.

Durata medie a ciclului celular pentru celulele de mamifere este de 18–20 de ore (T_{G1}=8–10 ore, T_S=6–7 ore, T_{G2}=3–5 ore, T_M= = 1 oră).

Celelalte metode propuse pentru determinarea ciclului celular (5, 71, 86, 87, 96, 101–104, 119, 121, 137, 142) au aplicații limitate la sisteme celulare cu caracteristici proliferative particulare sau depășesc prin complexitatea principiilor de calcul cadrul acestei expuneri.

3.2.3. Fracțiunea proliferativă

Alături de celulele care ocupă o poziție definită într-o anumită fază a ciclului și care în totalitatea lor alcătuiesc *compartimentul proliferativ*, există celule care în decursul perioadei de observație nu traversează ciclul *(compartimentul neproliferativ)*. Compoziția compartimentului neproliferativ este probabil inomogenă, în această categorie fiind incluse atît celule aflate în mod real în afara ciclului, cît și celule cu durate foarte lungi ale ciclului celular (115). Majoritatea sistemelor celulare, inclusiv tumorile maligne, constau atît din celule proliferative, ciclice, cît și din celule neproliferative. În tumorile maligne, o anumită proporție de celule se află numai temporar în afara ciclului, situația fiind analoagă cu cea a ficatului, unde o proporție mare de celule aflate în condiții normale în afara ciclului pot reintra în ciclu ca urmare a eliminării unei părți din populația celulară prin hepatectomie sau necroză toxică.

În cazul țesuturilor normale, celulele G0 sînt definite ca celule neciclice, avînd caracteristicile unor „celule de rezervă", care pot reintra în ciclu în faza G1 în cazul unui stimul adecvat. Conform unui alt punct de vedere, starea G0 corespunde unei situații tranzitorii postmitotice, în decursul căreia celula „decide" dacă va parcurge un nou ciclu mitotic sau dacă se va diferenția în vederea unei funcții specializate (fig. 32).

Între compartimentul proliferativ și neproliferativ are loc un flux celular bidirecțional, celulele G0 suplinind, în cazul țesuturilor normale, pierderile de celule din sistem.

O noțiune de o valoare deosebită pentru caracterizarea comportamentului unui sistem celular este cea de *fracțiune proliferativă*

Scanned with OKEN Scanner

(F.P.) (92), definită ca raportul dintre numărul de celule în ciclu (N_C) și numărul total de celule (N_T):

$$F.P. = N_C/N_T$$

Fracțiunea proliferativă poate fi determinată *in vitro*, prin marcare continuă cu timidină-H^3, sau *in vivo*, prin injecții repetate cu

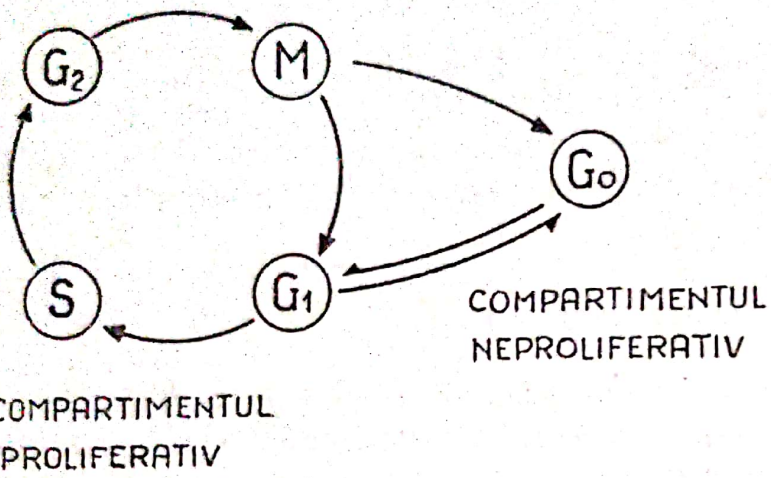


Fig. 32 — Relația dintre compartimentul celular proliferativ și neproliferativ.

timidină. Numărul maxim de celule care se marchează în condițiile expunerii continui la timidină reprezintă fracțiunea proliferativă.

Fracțiunea proliferativă poate fi calculată și din ecuația:

$$N_C/N_T = \frac{T_C(N_S/N_T)}{T_S}$$

unde datele necunoscute (T_C, T_S, N_S și N_T) sînt determinate din curba mitozelor marcate (68).

3.2.4. Evenimente sintetice în decursul ciclului celular

a) *Sinteza ADN* a fost minuțios investigată, iar durata sa, limitată la o anumită perioadă a interfazei, a permis delimitarea fazelor ciclului celular. Sinteza de ADN are loc, așa după cum am văzut, în faza S, cînd se produce dublarea ADN-ului din nuclei, care atinge valori tetraploide. Procesul de mitoză, cu formarea a două celule fiice, restabilește diploidia valorilor nucleare ale ADN (fig. 33).

Mai puțin cunoscute sînt mecanismele moleculare care declanșează sinteza de ADN. Intervenția unor „semnale" chimice citoplasmatice este sugerată de faptul că în celulele bi- sau multinucleate,

Scanned with OKEN Scanner

nucleii prezintă o sinteză sincronă de ADN (28). Aceste semnale par să fie nespecifice, deoarece acțiunea lor se manifestă și asupra nucleilor heterotransplantați în citoplasma unor celule provenite de la o altă specie. Un alt factor important pare a fi reprezentat de sinteza proteică. Astfel, tratarea celulelor cu inhibitori ai sintezei proteice (puromicina, cicloheximida) determină o reducere marcată sau chiar sistarea sintezei de ADN. Actinomicina D determină un efect similar printr-un mecanism indirect: oprirea sintezei de ARN mesager pentru sinteza proteică. Se pare că inițiatorul proteic este necesar pentru declanșarea replicării, dar odată începută, replicarea poate continua și în absența lui.

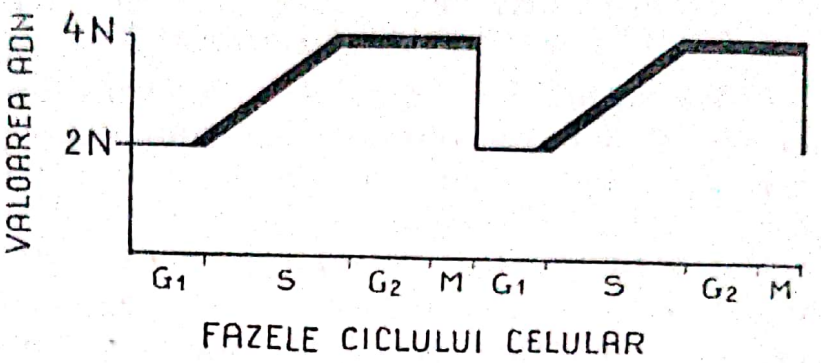


Fig. 33 — Valoarea ADN nuclear în funcție de faza ciclului celular.

Ritmul sintezei de ADN nu este identic pentru toți cromozomii. Există cromozomi care se replică la începutul fazei S și cromozomi care realizează sinteza de ADN tardiv în faza S. Acest fenomen este denumit asincronie intercromozomială. Nici segmentele aceluiași cromozom nu se replică simultan (asincronie intracromozomială). Se pare că regiunile heterocromatice ale cromozomilor, deci cele care rămîn condensate în decursul interfazei, sînt caracterizate printr-un model de replicare tardivă (52).

b) *Sinteza de ARN* se desfășoară continuu, în tot timpul ciclului celular, cu excepția mitozei (112). Oprirea sintezei de ARN începe spre sfîrșitul profazei și se extinde pînă în telofază. Ea ar putea fi explicată de starea condensată a cromozomilor, care nu permite transcrierea ADN-ului (97).

Ritmul sintezei de ARN, determinat prin încorporarea uridinei, crește de obicei lent în decursul fazei G1, se dublează în prima jumătate a fazei S și rămîne constant în a doua jumătate a fazei S și în faza G2 (109), ceea ce sugerează un efect de dozaj genic legat îndeosebi de duplicarea genelor responsabile de sinteza de ARN ribozomal. Se pare însă că în afară de controlul impus de dozajul genic, există mecanisme care adaptează cantitatea totală de ARN ribozomal ritmului sintezei proteice (97).

Se crede că și fracțiunile neribozomale de ARN sînt sintetizate în interfază, după un model asemănător sintezei de ARN ribozomal.

Scanned with OKEN Scanner

c) *Sinteza proteică* se desfăşoară, asemenea sintezei de ARN, continuu, în toată interfaza. Ritmul sintezei poate creşte treptat, realizînd o curbă de tip exponenţial, sau poate rămîne staţionar, dublîndu-se brusc într-un anumit timp al ciclului. Spre deosebire însă de sinteza de ARN, sinteza proteică continuă, nemodificată sau la o rată scăzută, şi în cursul mitozei.

Dublarea histonelor, care fac parte integrantă din structura cromozomilor, are loc în decursul fazei S.

Majoritatea enzimelor sînt sintetizate discontinuu, în decursul unor perioade limitate ale ciclului celular, caracteristice pentru fiecare enzimă. Unele enzime sînt însă sintetizate în tot cursul ciclului, acest aspect fiind întîlnit mai frecvent în celulele mamiferelor decît la eucariotele inferioare sau la procariote. Pentru enzimele care sînt inductibile, rata de inducţie se dublează într-un anumit timp al ciclului, care corespunde cu replicarea funcţională a genei corespunzătoare.

3.3. **Cinetica creşterii tumorale**

3.3.1. Generalităţi

În funcţie de caracteristicile lor proliferative, se deosebesc trei tipuri principale de sisteme celulare (115):

a) *Populaţii celulare stabile (neproliferative)* – exemplificate în organismele mamiferelor de celulele musculare şi nervoase.

b) *Populaţii celulare în echilibru*, în care rata producerii celulare este egală cu rata pierderilor celulare prin moarte sau migrare (creştere lineară).

c) *Populaţii celulare în expansiune*, în care rata de producere celulară depăşeşte rata de pierdere celulară.

3.3.2. Parametrii care caracterizează cinetica sistemelor celulare

Principalii parametri care caracterizează cinetica unui sistem celular sînt: timpul de dublare, timpul potenţial de dublare şi factorul de pierdere celulară.

a) *Timpul de dublare (TD)* este definit ca fiind timpul necesar pentru ca numărul de celule dintr-o populaţie să se dubleze. În cazul tumorilor, timpul de dublare este egal cu timpul de dublare a

Scanned with OKEN Scanner

volumului tumoral, dacă în decursul creşterii tumorilor nu intervin fenomene de necroză sau modificări ale cantităţii de lichid extracelular. Timpul de dublare se determină experimental prin măsurarea volumului tumoral sau a numărului de celule şi reprezentarea lor grafică în funcţie de timp.

b) *Timpul potenţial de dublare (TDP)* este timpul necesar în mod teoretic pentru ca numărul de celule dintr-o populaţie să se dubleze, pe baza ritmului de producere celulară şi în absenţa pierderilor de celule. Timpul potenţial de dublare poate fi calculat pe baza datelor care exprimă valoarea indicelui de marcare cu timidină, LI (care exprimă raportul dintre numărul de celule marcate cu timidină radioactivă — N şi numărul total de celule — N_T) şi a duratei fazei S (140). În cazul creşterii lineare (fig. 34 a), ecuaţia este:

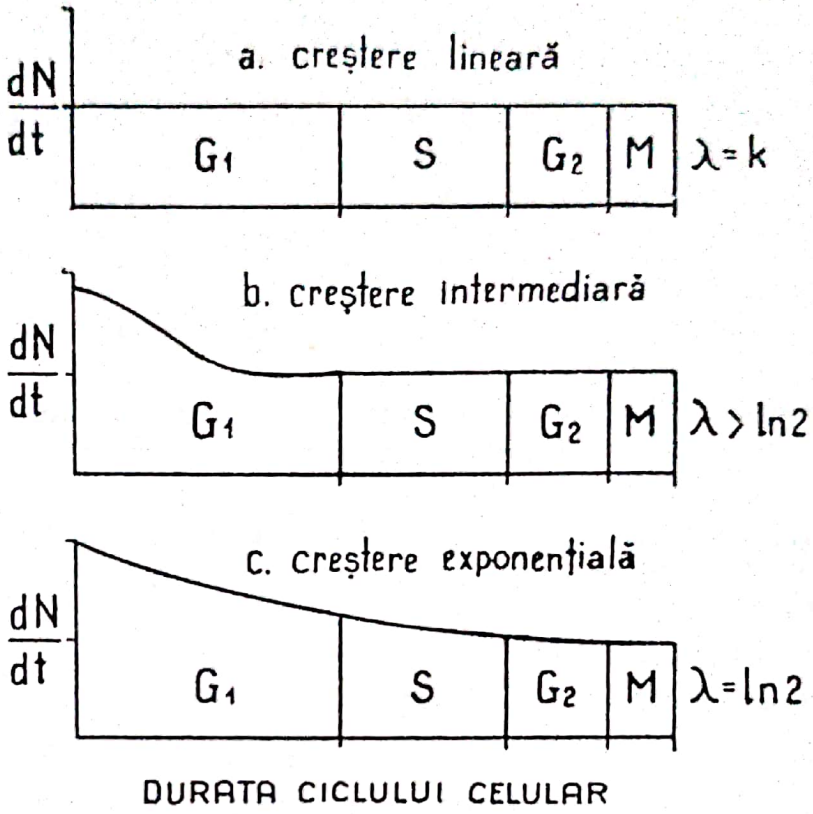


Fig. 34 — Reprezentare diagramatică a distribuţiei fazice a celulelor (modificat după Fabrikant şi Cherry, (41).

$$TDP_{lin} = T_S / LI$$

Dacă populaţia nu este în creştere lineară, trebuie să se ia în considerare faptul că probabilitatea de a găsi o celulă în diferite etape ale ciclului nu este constantă. Ca o consecinţă a acestui fapt, în ecuaţie trebuie introdusă o constantă de proporţionalitate λ, a cărei valoare se calculează în funcţie de aspectul diagramei de distribuţie fazică pentru fiecare populaţie celulară.

În cazul extrem al creşterii exponenţiale (fig. 34 c) definite de ecuaţia $y = b^x$, relaţia devine:

$$TDP_{exp} = \ln 2 \cdot T_S / LI$$

Majoritatea populaţiilor celulare *in vivo* nu sînt însă într-o stare ideală de echilibru sau de creştere exponenţială (fig. 34 b). Astfel, dacă proliferarea tumorală ar urma modelul unei curbe exponenţiale

Scanned with OKEN Scanner

simple, atunci timpul necesar pentru dublarea masei tumorale ar trebui să rămînă constant în tot cursul creşterii. În realitate însă, ritmul creşterii exponenţiale scade constant, pe măsură ce creşterea progresează. Acest fenomen poate fi exprimat printr-o ecuaţie gomperziană, în care procesul de creştere exponenţială suferă un proces de retardare progresivă exponenţială (73):

$$N(t) = N_0 e^{(1-e^{-\alpha t})\beta/\alpha} \qquad (a)$$

Această relaţie este soluţia următorului set de ecuaţii diferenţiale:

$$\frac{dN}{dt} = k\ N(t)$$
$$\frac{dk}{dt} = -\alpha^k \qquad (b)$$

unde N(t) reprezintă mărimea tumorii exprimată ca greutate sau ca număr de celule în momentul t. Conform ecuaţiilor (a) şi (b), creşterea tumorală este în fiecare moment exponenţială, dar simultan, proporţionalitatea factorului k scade exponenţial cu rata specifică α. În ecuaţia (a), β reprezintă valoarea lui k pentru condiţiile iniţiale $t=0$ şi $N(0)=N_0$ (128).

Această creştere intermediară între ritmul linear şi ritmul exponenţial poate fi exprimată prin relaţia:

$$TDP_{int} = 0{,}8 \cdot T_s / LI$$

Întrucît T_s poate fi măsurat cu oarecare precizie şi este destul de constant, ecuaţia de mai sus permite calcularea timpului potenţial de dublare pe baza cunoaşterii lui LI. Această metodă este aplicabilă şi în cazul tumorilor umane (41, 42) şi, deşi rezultatele sînt numai aproximative, se obţin totuşi informaţii preţioase referitoare la ritmul potenţial de creştere a ţesuturilor neoplazice.

c) Între timpul potenţial de dublare şi timpul de dublare există o discrepanţă care poate fi interpretată în termenii pierderii de celule din volumul tumoral. *Factorul de pierdere celulară* poate fi definit ca:

$$\Phi = 1 - \frac{TDP}{TD}$$

Φ fiind fracţiunea de celule formate la fiecare diviziune celulară, care sînt pierdute din volumul măsurat (135, 136). Nu este posibil să se precizeze dacă această pierdere este realizată prin migrarea unor celule sau prin moartea celulelor urmată de liză sau fagocitoză.

Valorile principalilor parametri cinetici din unele tumori experimentale sînt prezentate, pentru exemplificare, în tabelele I–III.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL I

VALOAREA PRINCIPALILOR PARAMETRI CINETICI ÎN TUMORILE DE ŞOARECE

Tumoarea	L. I. (%)	T_C (ore)	T_{G2} (ore)	T_S (ore)	T_{G1} (ore)	T_M (ore)	F. P.	T. D. (ore)	T.D.P. (ore)	Referinţă bibliografică
Adenocarcinomul 755 (Ziua 8-a)	18,0	14,0	4,5	6,0	2,5	1,0	0,45	38,6	26,4	
Ascita L 1210 (Ziua 5-a)	55,0	15,8	2,1	11,8	1,4	0,58	0,75		0,82	161
Carcinomul pulmonar Lewis (Ziua 8-a)	15,0	18,8	7,5	8,5	1,8	1,0	0,37	93,6	43,2	128
Sarcomul 180 solid (Ziua 5-a)		13,5	2,7	7,8	2,5	0,5	0,63	36,0	18,7	128
Tumoarea BICR/SA1 (zona mijlocie)		17,0	4,0	10,7	1,3		0,80			143
Ascita JB-1 (Ziua 7-a)		44,0	8,5	31,0	3,0	1,5	0,67	70,0		35
Melanomul B 16		14,0	3,8	7,5	1,3	1,4				11
Sarcomul NT 1	13,9	33,5	9,0	20,0	3,8			117,6	108,6	8
Carcinomul mamar anaplazic		16,0	7,5	7,5	1,0		0,50			43
Carcinomul mamar HB		15,5	7,0	7,5	1,0		0,55			43
Carcinomul mamar C3H	15,9	15,0	6,5	6,5	2,0	0,5	0,37		33,0	33
Ascita Ehrlich (Ziua 8-a)	20,0	19,1	7,5	8,8	1,8	1,0	0,49	36,0	36,0	128
Carcinomul Erhlich solid (Ziua 14-a)	22,0	17,8	3,5	10,7	3,6		0,37			77
Tumoarea DBAG		16,0	3,0	12,0	1,0					53
Tumoarea DBAH		16,0		10,0						53

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL II

VALOAREA PRINCIPALILOR PARAMETRI CINETICI ÎN TUMORILE DE ŞOBOLAN

TUMOAREA	L. I. (%)	T_C (ore)	T_{G1} (ore)	T_S (ore)	T_{G2} (ore)	T_M (ore)	F. P.	T.D. (ore)	T.D.P. (ore)	Referinţa bibliografică
Adenocarcinom mamar indus cu 7,12 DMBA	10,0	22,0	11,5	8,5	1,0	1,0	0,31	432,0	62,4	128
Tumoarea BICR/M1	34,2	19,0	8,0	8,0	3,0			22,7		128
Tumoarea BICR/A2	3,5	63,0	50,0	10,0	3,0			190,0		138
Tumoarea 5123 tc	0,191	25,0	11,5	8,0	5,5		0,78		31,8	120
Tumoarea 7794 A	0,037	46,0	37,0	6,0	3,0		0,40		114,3	120
Tumoarea 7793	0,017	44,0	24,0	13,0	7,0		0,40		483,0	120
Sarcomul Jensen		22,6	4,7	15,0	2,6	0,3				107
Tumoarea 3294 A		28,2	15,0	9,4	3,4	0,4	0,66	132,0	428,0	85
Tumoarea RIB 5	30,0	13,2	2,4	9,0	1,8	0,25	0,45		24,2	33
Tumoarea SSO	16,4	20,5	9,7	7,8	3,0	1,42	0,48		36,0	33
Tumoarea SSB 1	13,1	39,0	26,0	10,2	2,8	0,04	0,60		58,0	33
Ascita Yoshida		45,0	19,0	24,0	1,0	2,0				50

TABELUL III

VALOAREA PRINCIPALILOR PARAMETRI CINETICI ÎN TUMORILE DE HAMSTER

TUMOAREA	L. I. (%)	T_C (ore)	T_{G1} (ore)	T_S (ore)	T_{G2} (ore)	T_M (ore)	F. P.	T.D. (ore)	T.D.P. (ore)	Referinţa bibliografică
Plasmocitom Fortner (Ziua a 10-a)	11,0	15,0	4,0	8,2	1,8	1,0	0,21	2,8	2,3	128
Melanom melanotic (Ziua a 10-a)	12,0	17,5	9,8	6,0	0,7	1,0	0,43	3,1	1,6	128

Scanned with OKEN Scanner

3.3.3. Factori care influențează cinetica tumorală

Întîrzierea creșterii tumorale, fenomen care survine în fazele tardive ale proliferării tumorale (36, 70, 106), poate fi cauzată de trei categorii de factori: creșterea duratei ciclului celular, declinul fracțiunii de proliferare (79) și pierderea unui număr important de celule prin moarte sau migrare. Ponderea acestor factori este variabilă în diferitele sisteme celulare.

În tumorile ascitice, factorul predominant pare a fi reprezentat de alungirea progresivă a duratei ciclului celular, valoarea fracțiunii de proliferare fiind mai puțin afectată. În schimb, în tumorile solide se produce o scădere importantă a fracțiunii de proliferare pe fondul unei durate constante a ciclului celular (45–48, 60, 74, 100, 108, 122, 144, 126).

Prin studiul combinat autoradiografic și citofotometric al tumorii ascitice Ehrlich s-a demonstrat că în decursul proliferării tumorale are loc o acumulare progresivă de celule neciclice în stadiul G1 (58, 79, 108). Pe această bază s-a conchis că deciclarea poate surveni numai după mitoză și înaintea etapei de sinteză a ADN. În cazul epidermei, Gelfant (51) a demonstrat că celulele pot fi „blocate" și în G2. Un fenomen similar a fost observat de Post și Hoffman (110), care au studiat un sarcom al rozătoarelor. În tumorile ascitice NCTC 2472 (47) și JB-1 (35) se constată la început o acumulare de celule cu un conținut de ADN corespunzător valorii G1, iar în stadiile tardive o acumulare de celule cu un conținut de ADN ce corespunde valorii G2. Durate relativ lungi de rezidență în G2 au mai fost raportate în tumori hepatice induse cu coloranți azoici (126) și în unele sepatoame Morris (120). Aceste date arată că celulele tumorale pot fi oprite în stadii neciclice corespunzătoare atît fazei G1, cît și fazei G2 a ciclului celular.

Deși celulele neciclice nu reintră în ciclu *in situ*, în tumorile aflate în fazele finale ale evoluției, ele își mențin capacitatea de a se recicla, cu condiția existenței unor stimuli potriviți de mediu, așa cum sînt evacuarea parțială a ascitei sau transplantarea pe gazde noi (80). Celulele pot reintra în ciclu din ambele compartimente (G1O și G2O) (111). Retransplantarea pe animale noi provoacă o întîrziere tranzitorie în G2, urmată de creșterea rapidă a numărului de celule care sintetizează ADN (162).

Se pare însă că numai o parte a acestor celule neciclice sînt într-o fază reală de „repaus" (G0); celelalte sînt probabil celule sterile, incapabile de proliferare continuă (17, 75). S-ar produce astfel o tranziție progresivă a unei populații celulare dintr-o stare prolife-

Scanned with OKEN Scanner

rativă într-o stare neproliferativă din care, după un timp de tranzit variabil, ar avea loc pierderea celulelor prin moarte (36).

Ritmul de pierdere a celulelor prin moarte celulară depinde de localizarea celulelor tumorale în organismul gazdă. Astfel, celulele ascitei murine L1210 localizate în afara cavității peritoneale au murit la rata fracțională de 20%/zi. Moartea celulelor peritoneale a fost mult mai redusă (mai puțin de 5%/zi) și nu a influențat proliferarea generală a populației celulare (60).

Mecanismele care influențează ritmul de creștere a tumorilor nu sînt încă bine cunoscute. Se discută intervenția următorilor factori (77):

a) *Disponibilitatea agenților nutritivi, inclusiv a oxigenului.* Hipoxia poate cauza un declin al fracțiunii de proliferare, fără o alterare aparentă a duratei ciclului celular. Ea explică de ce ritmul de proliferare a tumorilor scade odată cu creșterea dimensiunilor lor (73, 105, 141). Acest fenomen este consecința faptului că stroma de susținere nu realizează un ritm de proliferare egal cu ritmul de proliferare a celulelor parenchimatoase. Mediul nutritiv al celulelor devine astfel tot mai sărac, odată cu creșterea distanței față de vasele sanguine și aceasta duce la reducerea ritmului de proliferare celulară și la moartea celulelor (30). Afectarea funcției capilarelor, consecința fenomenelor de stază, poate agrava hipoxia (145, 146). Oxigenul controlează ritmul de proliferare celulară prin intermediul fracțiunii de proliferare; influența sa asupra duratei ciclului celular pare să fie mai mică (147).

Mecanismul de acțiune a hipoxiei este încă neclar. Este posibil ca inhibarea proliferării celulare să fie consecința trecerii de la respirație la glicoliza anaerobă. O asemenea modificare provoacă o reducere a ratei de sinteză a ATP, care ar putea inhiba diviziunea celulară prin scăderea cantității de energie disponibilă.

b) *Acumularea produșilor toxici* pare să joace un rol important, îndeosebi prin prelungirea duratei ciclului celular. Este interesant faptul că nici durata fazei S, nici ritmul de proliferare a mielocitelor și a celulelor eritroide nucleate din măduva osoasă a șoarecilor purtători de ascită Ehrlich nu este influențată de prezența tumorii (76). Rezultate asemănătoare au fost obținute prin studiul cineticii celulelor din epiteliul jejunal al hamsterilor purtători de fibrosarcoame (12) și al celulelor din criptele duodenale la șoarecii cu tumori subcutanate Krebs-2 (123). Aceste fapte se pot explica în două feluri (77): fie că inhibitorii eliberați din tumoare au circulat în sîngele gazdei, dar nu au afectat proliferarea celulelor normale, acțiunea lor fiind tisular-specifică; fie că acțiunea inhibitorilor este nespecifică, dar concentrația lor este insuficientă pentru a afecta proliferarea țesuturilor gazdei. Datele lui Bichel (15) au demonstrat existența unui mecanism de *feed-back* negativ în ascita JB-1 a șoarecilor, manifestat

Scanned with OKEN Scanner

prin stoparea celulelor în faza G1 sau G2 datorită unor inhibitori specifici ai proliferării, care nu au acțiune încrucișată asupra celulelor altor tumori (16).

c) *Inhibiția de contact* nu pare să joace un rol prea important, deoarece concentrația celulelor în lichidul ascitic rămîne destul de constantă în decursul creșterii tumorale.

d) *Factorii imunologici* pot modifica ritmul de creștere a tumorilor, dar mecanismele prin care acționează nu sînt bine precizate. Decosse și Gelfant (32) au observat că în ascita Ehrlich unele celule pot fi temporar blocate în faza G2, datorită inhibiției imunologice; agenții imunosupresori (serul antilimfocitar) pot determina reciclarea acestor celule. În mod similar, în decursul rejecției imunologice a celulelor ascitice transplantate intraperitoneal la șobolani (63) are loc o prelungire a duratei perioadei G2, sugerînd că această fază constituie punctul principal de atac (64). Comparînd viteza de creștere a celulelor leucemice L1210 la șoareci izologi și hibrizi, Choquet și colab. (27) au constatat că la șoarecii hibrizi coeficientul de proliferare este mai mic, iar durata ciclului celular considerabil prelungită. Aceste fenomene sînt tranzitorii, iar retrotransplantarea pe șoareci izologi restabilește parametrii cinetici normali.

e) *Influențele hormonale*. Intervenția factorilor hormonali este ilustrată de studiul adenocarcinoamelor mamare induse cu 7, 12-dimetilbenzantracen la șobolani femele din linia Sprague-Dawley. Ovariectomia practicată acestor animale produce regresiunea tumorilor, concomitent cu scăderea indicelui de marcare cu timidină. Tratamentul cu estradiol și progesteron al șobolanilor cu tumori în faza de regresiune determinată de ovariectomie induce reluarea proliferării tumorale și ridicarea indicelui de marcare, care precede de multe ori creșterea macroscopică a tumorilor. Aceste rezultate sugerează că în tumorile în regresiune ar persista, în stare de latență, celule hormono-reactive care răspund la stimularea hormonală prin creșterea sintezei de ADN (127).

f) *Influența nivelului ploidiei* asupra duratei ciclului celular și a fazelor sale este încă insuficient studiată. În cazul carcinomului ascitic Ehrlich, atît durata fazei S, cît și durata ciclului celular au fost aproximativ duble într-o linie hipotetraploidă în comparație cu o linie diploidă și cu una hiperdiploidă (82). Similar, ciclul unei tumori ascitice hipodiploide derivate dintr-un carcinom mamar spontan al șoarecelui a avut parametri asemănători cu cei ai tumorii Ehrlich diploide, în timp ce într-un sarcom ascitic hipertriploid derivat dntr-un sarcom indus cu metilcolantren, valorile au fost de două ori mai lungi (82).

Este discutabil însă dacă influența ploidiei asupra ciclului este numai o consecință a modificării numărului de cromozomi sau dacă

Scanned with OKEN Scanner

intervin și fenomene conexe și, în primul rînd, modificarea imunogenicității celulelor.

g) *Cinetica tumorilor multiple.* Studiul influenței reciproce dintre tumorile multiple ale animalelor are implicații deosebite în patologia umană, deoarece această stare reproduce, într-o oarecare măsură, raporturile dintre tumoarea primitivă și metastaze.

În cazul sarcoamelor KHT ale șoarecilor s-a observat că atît curbele de creștere, cît și cinetica populațiilor celulare erau identice în tumorile unice și în tumorile multiple (118). Dimpotrivă, în cazul carcinoamelor mamare transplantate au fost demonstrate interacțiuni între tumorile multiple (25, 54). Această diferență pare a fi determinată de relațiile care se stabilesc între tumoare și gazdă. Astfel, sarcoamele KHT nu sînt influențate de starea hormonală endogenă, fiind absente diferențele de transplantare legate de sex; în plus, aceste tumori sînt imunologic compatibile cu gazda singeneică. Dimpotrivă, carcinoamele mamare, tumori mai bine diferențiate, sînt influențate de starea hormonală a gazdei; multe din aceste tumori sînt antigenice și pot provoca un răspuns imun din partea gazdei.

h) *Influența transplantărilor seriate.* Modificarea parametrilor ciclului celular în decursul transplantărilor seriate a tumorilor de grefă pare a fi dependentă de modificarea structurii histologice și citologice a tumorilor. Astfel, tumoarea NT1 a șoarecilor a prezentat o scădere a ritmului de creștere și o prelungire a duratei ciclului celular, concomitent cu modificarea tabloului histologic de la structura epitelială la o structură sarcomatoasă (8). Mai frecvent însă, transplantările repetate creează posibilitatea de selecție progresivă a celulelor cu cele mai mari potențialități pentru creștere rapidă, exprimată prin scurtarea duratei ciclului celular și a timpului de dublare (139).

3.4. **Cinetica tumorilor umane**

Cunoașterea particularităților cinetice ale tumorilor are o importanță deosebită pentru îmbunătățirea schemelor de chimioterapie și radioterapie (29, 65, 116, 152, 154, 156). Cu toate acestea, datele asupra particularităților proliferative ale tumorilor umane sînt incomplete. Această situație se datorește faptului că injectarea timidinei tritiate este limitată, din considerente etice, la un număr redus de pacienți. Pe de altă parte, numai tumorile cu anumite localizări (cancerele cutanate, cancerele colului uterin, exsudatele maligne) se pretează la biopsii repetate. S-a încercat depășirea acestor dificultăți prin utilizarea colcemidei (1,117) sau a vinblastinei (23). Administrarea acestor droguri determină blocarea mitozelor în metafază; nu-

Scanned with OKEN Scanner

mărul de metafaze care se acumulează variază în funcție de timpul care se scurge între momentul injectării agentului statmochinetic și prelevarea fragmentului de tumoare. Metoda permite calcularea ratei de intrare a celulelor în metafază și estimarea timpului potențial de dublare, dar exactitatea valorilor obținute este discutabilă.

O altă posibilitate de abordare este reprezentată de incubarea *in vitro* a fragmentelor de tumori într-un mediu de cultură care conține timidină tritată (22, 24, 41, 42, 56). Metoda permite determinarea indicelui de marcare și estimarea prin calcul a timpului potențial de dublare, a fracțiunii de proliferare și a factorului de pierdere celulară. Este astfel posibilă obținerea unor informații prețioase asupra unui mare număr de tumori, cu diferite localizări și aparținînd unor tipuri histologice variate. Întrucît între indicii de marcare obținuți *in vitro* și *in vivo* există o bună corelație, coeficientul de eroare introdus pare a fi minim.

Recent, Malaise și colab. (89) au prelucrat datele referitoare la 242 de tumori umane. Rezultatele autorilor pot fi sistematizate astfel:

a) *Indicele de marcare* variază în funcție de tipul histologic al tumorilor. El prezintă valori maxime în tumorile embrionare (30,0%) și hematosarcoame (29,2%) și valori reduse în carcinoamele spinocelulare (8,3%), tumorile mezenchimale (3,8%) și în adenocarcinoame (2,1%).

b) *Durata fazei S* a fost determinată în 22 de tumori umane, utilizînd curba mitozelor marcate după injectarea timidinei *in vivo*. T_S variază între 11 și 24 de ore; valoarea mediană, de 16 ore, a fost utilizată pentru calcularea timpului potențial de dublare și a fracțiunii proliferative.

c) *Timpul real de dublare* este mai scurt în tumorile embrionare (27 de zile) și în hematosarcoame (29 de zile) decît în tumorile mezenchimale (41 de zile) și în carcinoamele pavimentoase (58 de zile). El are valori maxime în adenocarcinoame (83 de zile).

d) *Timpul potențial de dublare* a fost calculat din relația (137):

$$TDP = \frac{T_S}{LI}$$

El variază între 1,66 zile în tumorile embrionare și 23,8 zile în adenocarcinoame.

e) *Fracțiunea de proliferare* a fost estimată din ecuația

$$FP = LI \cdot \frac{T_C}{T_S}, \text{ ținînd seama că } \frac{T_C}{T_S} \simeq 3.$$

Au fost obținute valori extrem de variabile, între 90% în tumorile embrionare și hematosarcoame și 6% în adenocarcinoame.

Scanned with OKEN Scanner

f) *Factorul de pierdere celulară* a fost calculat prin compararea timpului potențial de dublare cu timpul real de dublare, obținut printr-un studiu asupra metastazelor pulmonare, ale căror dimensiuni pot fi măsurate pe radiografii. Valorile sale sînt mai mari în tumorile embrionare și hematosarcoame decît în adenocarcinoame.

Diferențele dintre ratele de creștere a diferitelor tipuri de tumori umane sînt explicate, în cea mai mare parte, prin variațiile fracțiunii de proliferare. Cauzele acestui comportament cinetic diferit nu sînt cunoscute. După Malaise și colab. (89), atît rata de proliferare, cît și pierderea celulară din tumori ar reproduce situația din țesuturile normale corespunzătoare. Astfel, carcinoamele pavimentoase, hematosarcoamele și tumorile embrionare se formează în țesuturi cu un turnover înalt, în timp ce adenocarcinoamele (cu excepția tumorilor tractului gastrointestinal) și sarcoamele mezenchimale își au originea în țesuturi care se divid la o rată joasă.

În tabelul IV sînt prezentați, pentru exemplificare, paramertii cinetici ai unor tipuri de tumori umane.

S-a încercat, recent, *utilizarea autoradiografiei în conjuncție cu histopatologia*, cu scopul de a adăuga un factor dinamic tabloului histologic static (26, 44, 57, 62, 84). Datele publicate sînt încă insuficiente pentru a permite aprecieri asupra utilității acestui procedeu. Aplicarea sa în cazul tumorilor vezicii urinare, al căror comportament clinic este uneori în discordanță cu aspectul lor histologic, pare să ofere perspective interesante.

3.5. **Chimioterapia, radioterapia și ciclul celular**

În ultimul deceniu au fost obținute informații prețioase asupra caracteristicilor citocide ale drogurilor chimioterapeutice, în funcție de fazele ciclului celular. Aceste date au alimentat speranța unei terapii orientate pe baza proprietăților drogurilor, studiate pe modele experimentale simple. În cele ce urmează, vom face o analiză a situației actuale în acest domeniu.

În funcție de modul lor de acțiune, deosebim agenți care acționează specific într-o anumită fază a ciclului celular și droguri fără specificitate pentru fazele ciclului (tabelul V). Primii agenți omoară numai celulele aflate într-o fază sensibilă a ciclului; subpopulația de celule care nu trece prin faza sensibilă a ciclului rezistă chiar la doze mari. Substanțele nespecifice omoară celulele din toate fazele ciclului, în aproape aceeași măsură. Deși sînt afectate celulele aflate în toate fazele, aceste droguri au o eficiență maximă împotriva celu-

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL IV

VALOAREA PRINCIPALILOR PARAMETRI CINETICI ÎN TUMORILE UMANE

Tumoarea	L.I. (%)	I.M. (%)	T_C (ore)	T_{G1} (ore)	T_S (ore)	T_{G2} (ore)	T_M (ore)	F.P.	T.D.P. (ore)	Referința bibliografică
Carcinom bazocelular (piele)	5,0	0,7	97,0	62,0	19,0	16,0		0,3		46
Carcinom bazocelulare (piele)	9,0	0,7	67,0	36,0	19,0	12,0		0,4		46
Carcinoame bazocelulare (medie)	9,2		217,0	188,0	20,0	7,0	1,5			160
Carcinom bazocelular (piele)			97,0	66,0	19,0	12,0				90
Carcinom bazocelular (piele)			67,0	37,0	19,0	11,0				90
Papilom pavimentos al laringelui					15,6				120,0	40
Papilom pavimentos al laringelui					16,9				133,1	40
Papilom pavimentos al laringelui					11,6				168,2	40
Cancer laringian					22,1				204,5	40
Cancer laringian					18,8				214,8	40
Cancer bronșic					20,9				260,6	40
Cancer bronșic					23,3				196,4	40
Cancer esofagian					25,4				250 7	40
Cancer esofagian					22,0				235,0	40
Carcinom pavimentos (piele)	17,0	1,4	25,0	9,0	11,0	5,0		0,4		46
Carcinom pavimentos (piele)	10,0	1,3	48,0	30,0	12,0	6,0		0,4		46
Carcinom spinocelular (piele)	7,0	1,4	241,0		21,0			0,8		40
Carcinom pavimentos al colului uterin	0,40	0,045	15,5	1,1	11,8	1,3	1,3	0,53		10
Carcinom pavimentos al colului uterin	0,26	0,03	14,3	1,5	9,3	2,5	1,0	0,41		10
Cancer endometrial			110,4	48,0	60,0	4,0				29
Cancer ovarian	14,0		99,0	28,0	62,0	6,6	2,4			124
Melanom	0,25		36,1	16,3	14,5	5,3		0,62		56
Rabdomiosarcom			18,0	3,0	9,0	6,0				72
Astrocitom			18,0	7,0	6,0	5,0				72
Neuroblastom			26,0	5,0	12,0	9,0				72
Neuroblastom			26,0	5,0	14,0	7,0				72

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL V

CORELAȚIA DINTRE EFECTUL CITOCID ȘI FAZA CICLULUI CELULAR [DUPĂ RAJEWSKI (116), MODIFICAT].

Agentul	Efectul letal maxim					Referință bibliografică
	G1	G1-S	S	G2	M	
1. Antimitotice						
Colchicina			↓			
Demecolchina			↓			95
Griseofulvina			↓			
Vinblastina	↓		↓		↓	
2. Inhibitori ai sintezei ADN						
Hidroxiureea			↓			
Citozinarabinozida			↓			
Daunomicina		↓	↓			3, 4, 9, 13,
Pederina			↓			14, 55, 66,
FUDR	↓		↓	↓		67, 83, 95,
Camptotecina			↓			125, 129, 149,
Adriamicina		↓	↓		↓	150, 159.
Bleomicina			↓	↓		
Neocarcinostatina	↓		↓			
3. Inhibitori ai sintezei ARN						
Actinomicina D		↓				
Nogalamicina		↓				2, 14, 38, 95
4. Inhibitori ai sintezei proteice						
Cicloheximida		↓				
Puromicina		↓				
Streptovitacina A		↓	↓			14, 95
Pactamicina			↓			
Sparsomicina			↓			
5. Agenți alchilanți						
Azot-iperita		↓			↓	
Nor-dopanul		↓			↓	
Mitomicina D	↓				↓	
Thio-TEPA	↓				↓	14, 95, 99
BCNU		↓	↓			
CCNU		↓	↓			
Etilmetansulfonat	↓					
Metilmetansulfonat	↓					
6. Radiații						
Razele X		↓			↓	88, 130, 131, 148

lelor rapid proliferative. Natura specificității de fază a drogurilor nu este integral clarificată, dar ea este, în principiu, consecința unor reacții moleculare caracteristice pentru respectiva fază a ciclului. Faza de maximă sensibilitate la acțiunea drogului nu corespunde întotdeauna cu faza în care are loc moartea celulelor prin citoliză. Aceasta demonstrează că după interacțiunea cu un agent specific de fază, celulele își pot continua pentru o perioadă limitată de timp progresiunea în ciclu (116). Uneori, agenți care au mecanisme de acțiune diferite acționează cu eficiență maximă în aceeași fază a ciclului. Este logic ca agenții care inhibă sinteza ADN să afecteze celulele aflate în faza S. Celulele în faza S sînt însă extrem de sensibile și la inhibitori ai sintezei proteice, ca pactamicina și sparsomicina. Spalding și colab. (133) au arătat că în decursul replicării cromozomilor, celulele în faza S sintetizează și un nou complement de histone. Procesele de sinteză a ADN și histonelor sînt strîns cuplate, iar întreruperea sintezei histonelor determină inhibarea sintezei ADN. Aceasta ar explica sensibilitatea celulelor în faza S la inhibitorii sintezei proteice.

În accepțiunea curentă, drogurile care inhibă sinteza de ARN și proteine au potențialitatea de a afecta toate celulele aflate în faza G1, inclusiv celulele din organe vitale ca ficatul și rinichiul, producînd o marcată hepato- și nefrotoxicitate. Pe de altă parte, drogurile care afectează sinteza de ADN, inhibînd numai celulele în faza S, nu cauzează toxicitate hepato-renală, întrucît în ficat și în rinichi ritmul diviziunilor este foarte scăzut. Ele inhibă însă atît celulele canceroase în diviziune, cît și țesuturile în multiplicare rapidă, ca țesutul hematopoietic, mucoasa intestinală și orală – producînd leucopenie, diaree și stomatite (65).

Efectele majore ale administrării unui drog *in vivo* pot fi sistematizate astfel (156):

a) *Moartea unei anumite proporții a celulelor.* Cercetările lui Bruce și colab (20) au demonstrat rolul parametrilor cinetici, evidențiind existența unei sensibilități diferențiate între celulele sușă hematopoietice și celulele rapid proliferative ale unui limfom de șoarece. Pentru majoritatea drogurilor studiate, celulele limfomatoase au fost mai sensibile decît celulele sușă hematopoietice normale. Această deosebire nu este consecința unei sensibilități diferite inerente între celulele maligne și celulele normale, ci se manifestă și în cadrul unui anumit tip de celule, dacă ritmul de proliferare variază (21).

Modelul de interpretare cinetică imaginat de Bruce și colab. (20) a fost în aparență confirmat de faptul că în clinică chimioterapia s-a dovedit eficace în acele tumori umane ale căror celule proliferează rapid: leucemiile acute infantile, limfoamele, coriocarcinoamele și tumoarea Burkitt (132, 163). Cercetări ulterioare au arătat însă că mo-

Scanned with OKEN Scanner

delul lui Bruce (20) nu este aplicabil tumorilor umane. Astfel, timpul de dublare a tumorilor umane primare este mult mai lung decît în cazul limfomului studiat de Bruce (24, 40, 41, 89), pe cînd durata ciclului celular al celulelor medulare umane este mult mai scurtă decît a celulelor de șoarece. Faptul că în tumorile umane rata de proliferare este numai arareori mai înaltă decît a celulelor medulare face ca un model de chimioterapie bazat exclusiv pe proprietățile de proliferare diferențiată a celulelor normale și maligne să nu aibă multe șanse de succes. Situația se complică și mai mult dacă ținem seama de faptul că anemia, care însoțește adesea tumorile și leucemiile umane, determină creșterea ratei de proliferare a celulelor precursoare medulare încă de la începutul tratamentului (155).

b) *Blocajul temporar al celulelor în anumite faze ale ciclului celular.* Am arătat în paragrafele precedente că radiosensibilitatea și chimiosensibilitatea variază în decursul ciclului celular. Prin blocajul temporar într-o anumită etapă, de exemplu în faza de replicare a ADN sau în mitoză, se poate modifica repartizarea în ciclu a celulelor în proliferare (reasortare). Celulele care se află în faze insensibile ale ciclului se acumulează pe durata blocajului la începutul fazei blocate. După ridicarea blocajului, celulele pot parcurge următorul ciclu celular într-un mod parțial sincronizat (116).

În cazul iradierii, celulele sînt blocate în faza G2. Hidroxiureea, un drog care inhibă temporar sinteza de ADN (114), are în același timp proprietatea de a bloca trecerea celulelor din faza G1 în faza S. Ca rezultat al acestei semisincronizări, se produc variații ciclice ale radio- și chimiosensibilității după prima ședință de tratament (39, 49). S-a demonstrat astfel că efectul global al unei iradieri efectuate în două ședințe variază în funcție de lungimea intervalului care separă cele două ședințe și că aceste variații nu pot fi explicate de repararea leziunilor subletale (151). În mod similar, radiosensibilitatea celulelor unui limfom s-a modificat după administrarea de hidroxiuree (94).

Încercările de a exploata fenomenul de sincronizare parțială în chimioterapie s-au soldat cu rezultate variabile. Evident, dacă ar fi posibil să se modifice repartizarea în ciclu a celulelor unei populații în proliferare asincronă astfel încît să se producă o acumulare temporară de celule într-o anumită fază a ciclului, administrarea ulterioară a unui drog cu acțiune specifică pentru această fază ar trebui să fie mai eficace decît în condiții obișnuite (116). Cercetări experimentale folosind ca agent sincronizant hidroxiureea (116, 156) sau vincristina (69) au confirmat justețea acestei ipoteze, dar au relevat și limitele sale, de care trebuie să se țină seama în chimioterapia tumorilor umane:

Scanned with OKEN Scanner

1) Exploatarea fenomenului de sincronizare este extrem de critică, iar pentru alegerea intervalului dintre injecții este necesară cunoașterea exactă a cineticii țesuturilor sănătoase și a tumorilor (156). Deocamdată însă, cunoștințele noastre asupra cineticii țesuturilor normale sînt fragmentare și nu dispunem de o metodă rapidă și sigură de determinare a parametrilor cinetici ai tumorilor.

2) Ciclul celular al celulelor componente ale unei tumori este diferit și din acest motiv este greu de realizat deziderатul obținerii unei proporții suficiente de celule într-o fază specifică și sensibilă a ciclului celular (116).

3) Sincronizarea prealabilă crește eficacitatea agenților chimioterapeutici nu numai asupra tumorilor, ci și a țesuturilor hematopoietice, deoarece și celulele sușă sînt parțial sincronizate.

c) *Stimularea activității proliferative a celulelor supraviețuitoare.* Ca urmare a unei ședințe de radioterapie, viteza de proliferare a tumorilor se accelerează (59, 91). Această accelerare este proporțională cu doza iradiantă (151). Ea scade progresiv în timp, atingînd nivelul inițial în momentul cînd numărul de celule viabile revine la valorile dinaintea iradierii. Această accelerare a vitezei de proliferare nu este un fenomen specific pentru iradiere, ea fiind observată și după chimioterapie.

Factorii biologici care determină accelerarea vitezei de proliferare după radio- și chimioterapie nu sînt cunoscuți. Tubiana și Malaise (152) menționează următoarele posibilități: creșterea relativă a cantității de substanțe nutritive disponibile; eliberarea unor substanțe cu acțiune stimulatoare din celulele lizate; diminuarea concentrației de substanțe inhibitoare de tipul chalonelor.

Din punct de vedere cinetic, accelerarea vitezei de proliferare poate fi explicată prin modificarea valorilor a doi parametri: durata ciclului celular și numărul de celule angajate în ciclu. Modificarea duratei ciclului celular ca urmare a iradierii a fost demonstrată de Hermens și Barendsen (59), care au observat o reducere considerabilă a lui T_c într-un rabdomiosarcom de șobolan. Brown (18) a notat o ușoară prelungire a lui T_c în carcinoamele induse cu 7,12-dimetilbenzantracen în punga jugală a hamsterilor. Frindel și colab. (49) au remarcat o prelungire a duratei ciclului unei tumori ascitice. Van Peperzel (153) a constatat o scurtare a duratei ciclului într-un adenocarcinom de șoarece. Dimpotrivă, în patru tumori experimentale ale șobolanilor și șoarecilor, Denekamp și Thomlinson (34), nu observă modificări semnificative ale duratei ciclului celular ca urmare a iradierii acute. Aceste date arată că modificările ciclului celular sînt reduse și variabile și nu pot explica fenomenul de creștere accelerată consecutiv iradierii. Cel de al doilea parametru — fracțiunea de pro-

Scanned with OKEN Scanner

liferare – joacă un rol mult mai important. Ca urmare a aplicării unei doze terapeutice unice, o fracțiune importantă a celulelor sensibile ciclice este omorîtă. Intrarea în joc a unor mecanisme homeostatice, al căror substrat este încă incert, antrenează unele celule neproliferative în compartimentul proliferativ (37, 124). Aceste celule devin sensibile în etapa terapeutică următoare. Pe această bază, Mueller (98) a subliniat importanța conversiei din faza G0 în ciclu și a manipulării sale în avantajul terapiei. Readucerea în ciclu a unor celule aflate temporar în compartimentul neproliferativ, dar dotate cu capacitatea de a-și relua sinteza de ADN și de a se multiplica, este extrem de importantă, deoarece în acest compartiment se pot găsi, disimulate, celule „clonogene", responsabile de proliferarea tumorală (81). Utilizarea fenomenului de „recrutare" în terapeutică este însă limitată de faptul că drogurile cu capacitate de recrutare a celulelor tumorale exercită și o acțiune asemănătoare asupra celulelor din țesuturile sănătoase și îndeosebi asupra măduvei hematopoietice (154). Este de aceea necesar ca între seriile terapeutice să se interpună intervale de timp suficient de lungi pentru a permite repopularea măduvei și readucerea ei într-o stare de repaus, cel puțin parțial (154).

Încercările de aplicare în practică a radiosensibilizatorilor nu au îndreptățit, în general, speranțele. Pentru a se obține o radiosensibilizare preferențială a tumorilor în comparație cu cea a țesuturilor normale învecinate trebuie îndeplinite două criterii majore (19): durata ciclului celular al celulelor tumorale trebuie să fie mai scurtă decît al celulelor din țesutul normal, care limitează doza; substanța radiosensibilizatoare trebuie să ajungă la celulele tumorale pe cale intraarterială. Aceste condiții nu pot fi decît arareori îndeplinite.

Datele expuse demonstrează complexitatea factorilor care controlează proliferarea tumorală. Cunoștințele noastre în acest domeniu sînt încă reduse, iar studiile de cinetică celulară nu au rezolvat, așa cum se spera cu cîțiva ani în urmă, problema alcătuirii schemelor terapeutice. Volumul mare al cercetărilor care se desfășoară în acest domeniu lasă însă să se întrevadă speranța că în viitor va fi posibilă nu numai testarea cu mai mare eficiență a drogurilor, ci și elaborarea unor substanțe citostatice și a unor radiosensibilizatori noi, care să corespundă exigențelor menționate.

BIBLIOGRAFIE

1. AHERNE W., BUCK P. — *Brit. J. Cancer*, 1971, 25, 691.
2. BACCHETTI S., WHITMORE G. F. — *Radiat. Res.*, 1967, 31, 577.
3. BACCHETTI S., WHITMORE G. F. — *Cell Tiss. Kinet.*, 1969, 2, 193.

Scanned with OKEN Scanner

4. BARRANCO S. C., GERNER E. W., BURK K. H., HUMPHREY R. M. — *Cancer Res.*, 1973, *33*, 11.
5. BARRETT J. C. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1966, *37*, 443.
6. BASERGA R. — *Cancer Res.*, 1965, *25*, 581.
7. BASERGA R., MALAMUD D. — Autoradiography, Techniques and application, Ed. Harper & Row, New York, 1969.
8. BEGG A. C. — *Cell. Tiss. Kinet.*, 1971, *4*, 401.
9. BENEDICT W. E., HARRIS N., KARON M. — *Cancer Res.*, 1970, *30*, 2 477.
10. BENNINGTON J. L. — *Cancer Res.*, 1969, *29*, 1 082.
11. BERTALANFFY F. D., GIBSON M. H. L. — *Cancer Res.*, 1971, *31*, 66.
12. BETTS A., SEWALL E. L., TANGUAY R. — *Cancer Res.*, 1966, *26*, 898.
13. BHUYAN B. K., FRASER T. J., GRAY L. G. și colab. — *Cancer Res.*, 1973, *33*, 888.
14. BHUYAN B. K., SCHEIDT L. G., FRASER T. J. — *Cancer Res.*, 1972, *32*, 398.
15. BICHEL P. — *Europ. J. Cancer*, 1971, *7*, 349.
16. BICHEL P. — *Europ. J. Cancer*, 1972, *8*, 167.
17. BICHEL P., DOMBERNOWSKY P. — *Cell Tiss. Kinet.*, 1973, *6*, 359.
18. BROWN J. M. — *Radiat. Res.*, 1969, *43*, 153.
19. BROWN J. M. — *Radiology*, 1975, *114*, 189.
20. BRUCE W. R., MEEKER B. E., VALERIOTE F. A. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1966, *37*, 233.
21. BRUCE W. R., MEEKER B. E. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1967, *38*. 401.
22. CAMPLEJOHN R. S., AHERNE W. A. — *Brit. J. Cancer*, 1974, *29*, 487.
23. CAMPLEJOHN R. S., BONE G., AHERNE W. — *Europ. J. Cancer*, 1973, *9*, 577.
24. CHARBIT A., MALAISE E. P., TUBIANA M. — *Europ. J. Cancer*, 1971, *7*, 307.
25. CHESIRE P. J. — *Brit. J. Cancer*, 1970, *24*, 542.
26. CHILD R. P., SPRIGGS A. I., BERRY R. J. — *Acta cytol.*, 1972, *16*, 37.
27. CHOQUET CL., CHAVAUDRA N., MALAISE E. — *Europ. J. Cancer*, 1970, 6, 373.
28. CHURCH K. — *Exp. Cell Res.*, 1967, *46*, 639.
29. CLARKSON B., OTA K., OHKITA T., O'CONNOR A — *Cancer*, 1965, *18*, 1 189.
30. CLIFTON K. H., YATVIN M. B. — *Cancer Res.*, 1970, *30*, 658.
31. COWDRY E. V. — *Cancer cells*, Ed. W. B. Saunders Comp., Philadelphia, 1955.
32. DECOSSE J., GELFANT S. — *Science*, 1968, *162*, 698.
33. DENEKAMP J. — *Cancer Res.*, 1970, *30*, 393.
34. DENEKAMP J., THOMLINSON R. H. — *Cancer Res.*, 1971, *31*, 1 279.
35. DOMBERNOWSKY P., BICHEL P., HARTMANN N. R. — *Cell. Tiss. Kinet.*, 1973, 6, 347.
36. DOMBERNOWSKY P., HARTMANN N. R. — *Cancer Res.*, 1972, 32, 2 453.
37. DREWINKO B., BROWN B. W., HUMPHREY R., ALEXANIAN R. — *Cancer*, 1974, *34*, 526.
38. ELKIND M. M., KANO E., SUTTON-GILBERT H. — *J. Cell. Biol.*, 1969, *42*, 366.
39. ELKIND M. M., SUTTON H., MOSES W. B. — *J. Cell. comp. Physiol.* 1961, *58*, suppl. 1, 113.
40. FABRIKANT J. I. — *Brit. J. Cancer*, 1970, *24*, 122.
41. FABRIKANT J. I., CHERRY J. — *Ann. Otol. Rhinol Laryngol* 1969, *78*, 326.
42. FABRIKANT J. I., WISSEMAN C. L., VITAK M. J. — *Radiology*, 1969, *92*, 1 309.

Scanned with OKEN Scanner

4. MODIFICĂRI CROMOZOMIALE EREDITARE ȘI PREDISPOZIȚIA PENTRU CANCER

4.1. Introducere

Prezența unor modificări cromozomiale ereditare reprezintă, în unele situații, o condiție predispozantă pentru apariția cancerelor. În această categorie intră sindroamele caracterizate printr-o „fragilitate cromozomială" crescută (anemia Fanconi, sindromul Bloom, ataxia-teleangiectazia), precum și unele afecțiuni determinate de anomalii ale cromozomilor somatici (trisomia 21, trisomia 18, deleția unui cromozom din grupa D) sau sexuali (sindromul Klinefelter, sindromul Turner, sindromul de „feminizare testiculară").

4.2. Anemia Fanconi

Anemia Fanconi este o afecțiune cu transmitere autosomală recesivă, caracterizată prin pancitopenie progresivă, malformații ale scheletului care interesează îndeosebi membrele superioare și pigmentație tegumentară particulară, datorită depunerii de melanină. Evoluția este gravă, iar moartea survine adesea prin hemoragii sau infecții intercurente.

Schroeder (52) a demonstrat, în anul 1964, o *frecvență crescută a anomaliilor cromozomiale*, constînd îndeosebi în rupturi cromatidice și cromozomice, în culturile de limfocite ale pacienților. Aceste rezultate au fost confirmate de numeroși autori (3, 5, 18, 46, 48, 50, 60), iar prezența anomaliilor cromozomiale este considerată ca un simptom esențial al afecțiunii (20). Cele mai frecvente anomalii observate sînt rupturile și lacunele cromatidice prezente, în funcție de autori, la 19–85% din celulele examinate (20). Cercetările efectuate cu ajutorul metodelor clasice de colorație nu au relevat o distribuție particulară a rupturilor. Utilizînd o tehnică de bandare Giemsa, Koskull și Aula (35) au demonstrat însă că rupturile sînt localizate exclusiv la nivelul regiunilor G palid colorate, corespunzătoare benzilor R.

Scanned with OKEN Scanner

Regiunile distale ale cromozomilor din grupa A prezintă un exces de rupturi, în timp ce ariile centromerice sînt mai puţin afectate. Există o interesare preferenţială a anumitor loci cromozomiali (3q27 şi 13q32). Cromozomii sexuali prezintă, comparativ, mai puţine rupturi.

Incidenţa anomaliilor de tip cromozomic (cromozomi dicentrici şi inelari, fragmente, translocaţii sau inversii pericentrice) este de 20% în celulele pacienţilor, în comparaţie cu 3% în celulele martorilor (20).

Figurile triradiale şi cvadriradiale, a căror frecvenţă este nulă la martori, apar în 1–2% din celulele bolnavilor. Figurile triradiale sînt considerate de Lejeune şi colab. (37) drept rezultatul endoreduplicării selective a unui segment dintr-un braţ cromozomial. În anemia Fanconi, frecvenţa crescută a lacunelor cromozomiale ar putea favoriza producerea acestor endoreduplicări (20). Figurile cvadriradiale sînt interpretate de German (15) ca reprezentînd substratul schimburilor somatice între cromozomi. Ele par să afecteze mai des cromozomii omologi, dar sînt observate şi în cazul cromozomilor neomologi (35).

Anomaliile cromozomiale nu par a fi limitate la celulele limfatice, deşi prezenţa lor în celulele medulare este încă controversată. Bloom (3), Hoefnagel şi colab. (31), Schmid (50) şi Dosik şi colab. (9) nu au observat anomalii la pacienţii examinaţi. În alte publicaţii, însă, se semnalează modificări cromozomiale (constînd îndeosebi în lacune şi rupturi cromatidice, dar şi în apariţia de cromozomi dicentrici sau inelari) în 10–20% din celule (21, 30, 53, 55, 62). În unele cazuri, aceste anomalii sînt mai complexe, ducînd la apariţia unor clone pseudodiploide (8, 40). Astfel, pacientul examinat de Lisker şi Cobo de Gutiérrez (40) prezenta, în 40% din celulele medulare, o constituţie pseudodiploidă datorită prezenţei unui cromozom D anormal (Dq+). S-ar putea ca rupturile observate în cromozomii celulelor medulare să determine o pierdere progresivă de celule şi să fie astfel responsabile de instalarea anemiei aplazice (53). Există, de asemenea, o frecvenţă ridicată a rupturilor cromozomiale şi a rearanjamentelor în culturile de fibroblaste (55, 62).

O incidenţă crescută a anomaliilor cromozomiale a fost remarcată şi la rudele pacienţilor (9, 20, 38). În studiul lui de Grouchy şi colab. (20), numărul mediu de anomalii per celulă variază la martori, la heterozigoţi şi la bolnavi, conform raportului 1:2:5.

Mecanismul rupturilor cromozomiale nu este cunoscut. Swift şi Hirschhorn (55) consideră că rupturile ar fi consecinţa unei fragilităţi determinate de o structură anormală a cromozomilor. O interpretare similară i se datoreşte lui Schmid (50), după care mecanismul rupturilor ar consta într-o tulburare, determinată genetic, a

Scanned with OKEN Scanner

metabolismului acizilor nucleici. Faptul că rupturile au o localizare specifică (35) reflectă o diferențiere longitudinală a structurii cromozomilor. Studiul cromozomilor cu tehnici de fluorescență a sugerat că ADN-ul de la nivelul benzilor Q și G prezintă o concentrație ridicată în AT. Interbenzile Giemsa, unde se concentrează rupturile în anemia Fanconi, ar corespunde deci unor segmente bogate în GC, ceea ce reprezintă un argument în favoarea specificității mecanismului implicat în producerea rupturilor. Obe și colab. (44) au sugerat că aspectul pulverizat al cromatinei ar putea fi consecința unei condensări cromozomiale premature. Un mecanism complet diferit a fost propus de Allison și Paton (2), care presupun că fragilitatea crescută a membranelor lizozomiale ar avea drept urmare eliberarea enzimelor conținute, iar ADN-aza ar produce rupturile cromozomiale.

Pacienții cu anemie Fanconi sînt adesea victimele unor *afecțiuni maligne*, leucemice (leucemii mieloblastice sau monocitare acute) sau tumorale (7, 9, 55). O frecvență crescută a leucemiilor a fost observată și la părinții sau rudele colaterale ale bolnavilor (13, 54). De Grouchy și colab. (20) presupun că remanierile cromozomiale ar fi direct responsabile de apariția cancerului. În această situație, factorii interni din anemia Fanconi ar juca un rol comparabil cu cel al factorilor externi (radiații, virusuri, substanțe chimice cancerigene), iar aberațiile cromozomiale ar constitui modul comun de acțiune a diferiților factori cancerigeni.

Pe de altă parte, ar fi posibil ca prezența anomaliilor cromozomiale să crească susceptibilitatea celulelor la acțiunea factorilor cancerigeni. În favoarea acestei ipoteze există argumente experimentale convingătoare (79). Recent, Todaro și colab. (59) au demonstrat că fibroblastele umane diploide cultivate în prezența virusului simian 40 (SV40) sau a adenovirusului tip 12 (58) se transformă neoplazic. Prezența transformării este demonstrată de modificarea morfologiei celulelor, care își pierd orientarea și se dispun multistratificat. Studiul comparativ al transformării fibroblastelor normale și a fibroblastelor provenite de la pacienții cu anemie Fanconi a demonstrat că incidența transformării este de 10—50 de ori mai mare la persoanele din ultima categorie. Părinții heterozigoți ai copiilor cu anemie Fanconi manifestă o susceptibilitate crescută la transformare, în absența unor manifestări clinice, hematologice sau citogenetice. Pornind de la aceste constatări, Miller și Todaro (43) au propus utilizarea sensibilității la transformare drept test de depistare a persoanelor care prezintă un risc crescut de apariție a cancerului.

Scanned with OKEN Scanner

4.3. **Sindromul Bloom**

Sindromul Bloom prezintă o transmitere recesivă simplă, ceea ce indică că o singură genă (denumită b1) și, respectiv, o singură enzimă este afectată. Indivizii homozigoți afectați prezintă constituția bl/bl, iar heterozigoții, normal dezvoltați, au genotipul bl/-.

Înălțimea pacienților este redusă, iar faciesul are un aspect particular: îngust, cu nasul proeminent și cu mandibula retractată. Pe față apare, în cursul copilăriei, un eritem teleangiectatic cu aspect de fluture. Pe buze și pleoape pot apărea bule, cruste și cicatrice (16). Expunerea la soare agravează aceste simptome.

Cea mai caracteristică aberație cromozomială, evidențiată în limfocitele pacienților, constă în apariția unor configurații cvadriradiale (17, 18), care rezultă dintr-un schimb de segmente cromozomiale între doi cromozomi omologi. Punctul de schimb preferat pare a fi reprezentat de regiunea centromerică (16). Alte anomalii, mai puțin caracteristice, constau în apariția de rupturi, fragmente acentrice și cromozomi dicentrici. Cromatina are uneori aspect pulverizat sau segmentat (47).

Pacienții cu sindrom Bloom manifestă o susceptibilitate crescută la apariția neoplaziilor. Opt din cei 44 de pacienți studiați de German (16) au dezvoltat cancere (4 leucemii și 4 cancere ale tubului digestiv).

4.4. **Ataxia-teleangiectazia (sindromul Louis-Barr)**

Simptomatologia pacienților cu ataxie-teleangiectazie este dominată de prezența teleangiectaziilor oculo-cutanate, a ataxiei progresive și a întîrzierii mintale. Sistemul imun prezintă deficiențe multiple: scăderea nivelului imunoglobulinelor IgA și IgE, hipoplazie timică și deprimarea transformării blastice a limfocitelor *in vitro*.

Pacienții cu ataxie-teleangiectazie prezintă o incidență crescută a tumorilor maligne (reticulosarcoame, boală Hodgkin, limfosarcoame, cancere gastrice, meduloblastoame, glioame). Prezența neoplaziilor sistemului limfoid ar putea reprezenta o manifestare în cadrul unei afectări mai generale a sistemului limfatic. Apariția celorlalte tipuri de neoplasme sugerează însă fie o deficiență a mecanismului de supraveghere imună, fie intervenția unui factor necunoscut care crește

Scanned with OKEN Scanner

posibilitatea ca o celulă normală să se transforme într-o celulă malignă (23). Prezența anomaliilor cromozomiale la acești pacienți pledează în favoarea ultimului mecanism. Ele constau în rupturi și lacune (19, 22, 27, 39, 49, 51), cromozomi dicentrici (49, 51) și rearanjamente (23). Rupturile cromozomiale interesează preferențial unul din cromozomii grupei D (49, 51). Tehnicile de bandare l-au identificat recent ca un membru al perechii nr. 14 (28), banda specific implicată fiind 14q12 (23).

4.5. **Sindroame genetice caracterizate prin aneuploidie**

În unele sindroame genetice caracterizate prin aneuploidie se constată o frecvență crescută a leucemiilor sau cancerelor.

Astfel, copiii cu *trisomie 21* prezintă o creștere importantă a frecvenței leucemiilor acute în comparație cu populația martoră (36). Se menționează și asocieri între sindromul de trisomie 21 și angioblastoame, glioame, glioblastoame sau hemangioendotelioame ale măduvei spinării (42), rabdomiosarcoame intracraniene (12) și seminoame (41).

Un interes deosebit îl prezintă agregarea în aceeași familie a unor indivizi normali, a unor indivizi cu boala Down și a altora cu leucemie (4, 10, 25). Pentru a explica această situație, Hecht și colab. (26) propun următoarele mecanisme:

a) Rearanjamentele structurale ale cromozomilor ar putea determina segregări anormale, explicînd aneuploidia care face ca celulele să devină mai susceptibile la acțiunea agenților leucemogeni.

b) Existența unei infecții virale, cu încorporarea genomului viral în celule, ar putea induce atît anomaliile cromozomiale, cît și leucemia.

c) Prezența bolilor autoimune, relativ frecvent întîlnite la rudele pacienților cu aneuploidie, ar putea determina anomalii ale diviziunii celulare și posibile rearanjamente cromozomiale ulterioare.

d) Intervenția unei gene mutante recesive, acționînd în sensul unei creșteri a frecvenței aberațiilor cromozomiale, pare mai puțin plauzibilă.

Trisomia cromozomului 18 se asociază destul de frecvent cu tumoarea Wilms (14), motiv pentru care s-a sugerat că o genă reglatoare ar fi localizată pe acest cromozom (34).

În cazul *sindromului de deleție a unui cromozom din grupa D* s-a observat o incidență crescută a retinoblastoamelor (45). Cu ajutorul

Scanned with OKEN Scanner

tehnicilor de bandare, cromozomul afectat a fost identificat ca un nr. 13, deleția fiind de tip interstițial (61).

Prezența *anomaliilor cromozomilor sexuali reprezintă*, de asemenea, o condiție predispozantă pentru cancer. Astfel, bărbații cu sindrom Klinefelter prezintă o incidență a cancerului mamar similară cu cea observată la femei (6, 32), iar în sidromul Turner și în sindromul de „feminizare testiculară", gonadele disgenetice sînt adesea sediul gonadoblastoamelor sau disgerminoamelor (1, 11, 24, 56, 57).

Este greu de explicat felul în care anomalii cromozomiale atît de diferite măresc susceptibilitatea pentru cancer. În cazurile cînd anomaliile cromozomiale se asociază cu tumori specifice (sindromul de trisomie 18, sindromul de deleție a cromozomului 13, anomaliile cromozomilor sexuali), relația pare a fi directă. Alteori însă pacienții sînt victimele unor tumori cu localizări diferite și de tipuri histologice variate (anemia Fanconi, sindromul Bloom, ataxia-teleangiectazia). Pentru a explica această situație, German (16) a făcut o paralelă între sindroamele de instabilitate cromozomială și cancerul indus de radiațiile ionizante. Expunerea la radiații determină aberații cromozomiale în unele celule somatice. Secvența evenimentelor care duc la apariția cancerului poate fi sistematizată astfel: *a*) iradierea induce mutații în materialul genetic al celulelor somatice; *b*) urmează o perioadă de latență de durată variabilă (cîteva luni pînă la cîțiva ani); *c*) apare cancerul clinic. În cazul persoanelor cu instabilitate cromozomială, secvența evenimentelor apare similară: *a*) mutația materialului genetic are loc în toate celulele în proliferare, predominînd la adult în țesuturile în diviziune rapidă (de exemplu, țesuturile limfoide, măduva osoasă, mucoasa tubului digestiv și pielea); *b*) perioada de latență, a cărei durată este de ani; *c*) cancerul clinic. În nici una din aceste două grupe nu se poate exclude intervenția unui virus ubicuitar, endogen sau exogen, care ar interacționa cu celulele mutante.

Ipoteza lui German (16) poate fi pusă de acord cu teoria lui Knudson (33, 34), care presupune că toate tumorile, ereditare sau neereditare, sînt consecința unui proces care decurge în cel puțin două etape. Prima etapă este în mod obligatoriu mutațională, însă acest termen este utilizat în sens larg, el incluzînd orice tip de modificare genomică (mutație punctiformă, deleții, duplicații, rearanjamente sau prezența unui genom viral). Evenimentele care caracterizează această etapă au loc în celulele germinale — în cazul formelor ereditare ale tumorilor — și în celulele somatice — în cancerele datorite exclusiv factorilor de mediu. A doua etapă, probabil tot mutațională, are loc în celulele somatice, care vor deveni sediul proliferării neoplazice. Întrucît celulele unei persoane care prezintă

Scanned with OKEN Scanner

o mutație germinală au parcurs deja prima etapă spre malignizare, probabilitatea statistică ca ele să fie afectate de o nouă mutație este mai mare decît la persoanele normale, ale căror celule trebuie să devină ținta a două evenimente mutaționale consecutive.

BIBLIOGRAFIE

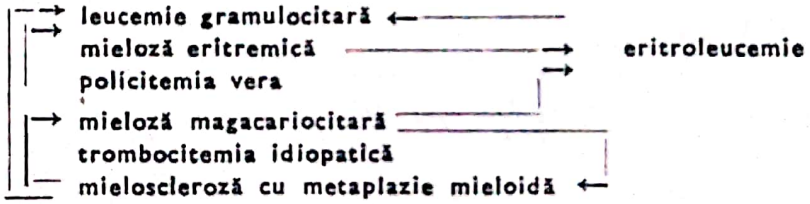
1. ADACHI H., KISHI Y., MATSUDA H. și colab. — *J. jap. obstet. gynec. Soc.*, 1968, *15*, 79.
2. ALLISON A. C., PATON G. R. — *Nature (Lond.)*, 1965, *207*, 1 170.
3. BLOOM G. E., WARNER S., GERALD P. S., DIAMOND L. K. — *New Engl. J. Med.*, 1966, 274, 8
4. BUCKTON K. E., HARNDEN D. G., BAIKIE A., WOODS G. E. — *Lancet*, 1961, *i*, 1 495.
5. CHIOREANU L., WIENER F. — *Rev. Roum. Embryol. Cytol.*, 1968, *5*, 149.
6. COLEY G. M., OTIS R. D., CLARK W. E. — *Cancer*, 1971, *27*, 1 476.
7. COWDELL R. H., PHIZACKELEY P. J. R., PYKE D. A. — *Blood*, 1955, *10*, 788.
8. CROSSEN P., MELLOR J., ADAMS A., GUNZ F. — *Pathology*, 1972, *4*, 27.
9. DOSIK H., HSU L. Y., TODARO G. J. și colab. — *Blood*, 1970, *36*, 341.
10. EBBIN A. J., HEATH C. W. Jr., MOLDOW R. E., LEE J. — *J. Pediat.*, 1968, *73*, 917.
11. FERRIER P. E., FERRIER S. A., SCHÄRER K. O. și colab. — *Helv. paediat. Acta*, 1967, *22*, 479.
12. FOLEY J. D., LEMON H. M. — *Nebraska St. med. J.*, 1968, *53*, 384.
13. GARRIGA S., CROSBY W. H. — *Blood*, 1959, *14*, 1 008.
14. GEISER C. F., SCHINDLER A. M. — *Pediatrics*, 1969, *44*, 111.
15. GERMAN J. — *Science*, 1964, *144*, 298.
16. GERMAN J. — în: Chromosomes and cancer (sub red. J. German) Ed. John Wiley and Sons, New York-Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 601.
17. GERMAN J., ARCHIBALD R., BLOOM D. — *Science*, 1965, *148*, 506.
18. GERMAN J., CRIPPA L. P. — *Ann. Génét.*, 1966, *9*, 143.
19. GROPP A., FLATZ G. — *Humangenetik*, 1967, *5*, 77.
20. GROUCHY J. DE, NAVA C. DE, MARCHAND J. C. și colab. — *Ann. Génét.*, 1972, *15*, 29
21. GUANTI G., PETRINELLI P., SCHETTINI F. — *Humangenetik*, *1971*, *13*, 222.
22. HAERER A. F., JACKSON J. F., EVERS C. G. — *J. Amer. med. Assoc.*, 1969, *210*, 1 884
23. HARNDEN D. G. — în: Chromosomes and cancer (sub red. J. German), Ed. John Wiley and Sons, New York-Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 619.
24. HAUSER G. A. — în Intersexuality (sub red. C. Overzier), Academic Press, New York, 1963, p. 253.
25. HEATH C. W. JR., MOLONEY W. C. — *New Engl. J. Med.*, 1965, 272, 882.
26. HECHT F., BRYANT J. S., GRUBER D., TOWNS P. L. — *New Engl. J. Med.*, 1964, *271*, 1 081.
27. HECHT F., KOLER D. R., RIGAS D. A. și colab. — *Lancet*, 1966, *ii*, 1 193.

Scanned with OKEN Scanner

5. SINDROAMELE MIELOPROLIFERATIVE

5.1. Introducere

Termenul de sindrom mieloproliferativ a fost introdus de Dameshek (5) în 1951, pentru a desemna o serie de afecțiuni caracterizate prin proliferarea uneia sau a mai multor linii celulare – eritroblastică, granulocitară, megacariocitară și reticulo-fibrocitară. Proliferarea nu interesează numai teritoriile medulare, ci și alte organe (splină, ficat, ganglioni), care pot deveni sediul unei metaplazii mieloide. Astfel definit, sindromul mieloproliferativ cuprinde leucemia granulocitară (mieloidă) cronică, mielofibroza (mieloscleroza) cu metaplazie mieloidă, policitemia vera, tromboctemia idiopatică, mieloza eritremică acută și eritroleucemia. Unitatea sindromului este demonstrată de existența unor forme clinice intermediare, precum și de faptul că unele afecțiuni pot evolua spre un alt cadru nosologic. Aceste tranziții au fost schematizate de Rappaport (44) astfel:



Diagnosticul diferențial al bolilor mieloproliferative este adesea dificil, iar studiul cromozomilor are un rol important în clarificarea diagnosticului și în formularea prognosticului acestor afecțiuni.

5.2. Policitemia vera

Anomaliile cromozomiale din policitemia vera nu sînt uniforme din două motive: unele cazuri fuseseră tratate înaintea examenului citogenetic cu fosfor radioactiv (P^{32}), care are proprietatea de a produce aberații cromozomiale; alte cazuri se transformaseră

Scanned with OKEN Scanner

în momentul examinării în leucemii acute (4). Datele referitoare la constituția cromozomială a policitemiei vera pot fi sistematizate astfel:

a) *Policitemia vera cu cromozomi normali*

Cazurile de policitemia vera cu cariotipuri normale sînt destul de frecvente, ele fiind raportate de obicei la persoane netratate. În statistica lui Cervenka și Koulischer (4), bazată pe cazurile publicate de Kay și colab. (21), Kemp și colab. (22), Koulischer și colab. (27) și Nowell și colab. (39), 55 din 86 de cazuri (65%) aveau cromozomi normali. Visfeld și colab. (60) observă cariotipuri normale la 33 din 55 de bolnavi tratați și la 15 din 17 bolnavi netratați.

b) *Policitemia vera cu marker F–*

Delația brațelor unui cromozom din grupa F (F–) a fost descrisă de Kay și colab. (21), Lawler și colab. (30, 31) și Millard și colab. (34). Utilizînd o tehnică de bandare, Reeves și colab. (45) au identificat recent cromozomul anormal ca fiind un cromozom nr. 20, care prezintă o deleție a brațelor sale lungi. Majoritatea cazurilor care prezentau această anomalie fuseseră tratate, dar modificarea poate să apară și în absența terapiei (60).

c) *Policitemia vera cu anomalii ale cromozomilor din grupa C*

După Spiers (53), cea mai comună anomalie în policitemia vera netratată este reprezentată de prezența unui cromozom suplimentar în grupa C. Această anomalie a fost observată de Nowell și Hungerford (40) și de Westin (63), care au identificat cromozomii suplimentari ca aparținînd perechilor 8 sau 9.

În alte cazuri a fost observată absența unui cromozom C (40) sau anomalii structurale ale cromozomilor din această grupă. Astfel, Tsuchimoto și colab. (58) au observat deleția unui cromozom nr. 7, iar Staven și colab. (55) au descris un caz care prezenta deleția cromozomilor 8 și 12 /del(8)(q12) și del(12)(p12)/ și o translocație între cromozomii 1 și 8 /trans(1;8)(q4;q12)/.

d) *Policitemia vera cu cromozom Philadelphia*

Majoritatea cazurilor de policitemia vera Ph^1-pozitive s-au transformat în leucemie granulocitară cronică (12, 22, 27). Trei dintre cazurile examinate de Modan și colab. (36) au prezentat însă un cromozom de tip Ph^1 în absența leucemiei. Cum însă acest studiu a fost publicat înainte de apariția tehnicilor de bandare, identificarea cromozomului nu este certă.

e) *Policitemia vera cu celule aneuploide*

Prezența aneuploidiei (hipo- sau hiperdiploidie) sau a unor aberații cromozomiale nespecifice (rupturi, fragmente, cromozomi mar-

Scanned with OKEN Scanner

keri) a fost observată atît la bolnavii trataţi, cît şi în absenţa tratamentului (10, 27, 36, 61). Apariţia clonelor anormale pare a fi mai frecventă în cazurile care evoluează rapid spre mielofibroză sau spre leucemie (60).

5.3. **Eritroleucemia**

Stările leucemice în care predomină proliferarea celulelor anormale din seria eritrocitară sînt denumite cu diferiţi termeni — eritroleucemie, mieloză eritremică, sindrom Di Guglielmo. Ele sînt cuprinse în cadrul sindroamelor mieloproliferative şi se caracterizează printr-o proliferare progresivă a celulelor imature şi atipice din seria eritroidă şi mieloidă. Faza preleucemică, adesea cu o durată apreciabilă, poate fi confundată cu anemia megaloblastică, anemia hipoplastică constituţională şi cu policitemia vera.

Aproximativ jumătate din cazurile de eritroleucemie nu prezintă modificări citogenetice (14, 25, 56). Atunci cînd sînt prezente, anomaliile cromozomiale se prezintă sub trei aspecte: aneuploidie, poliploidie şi rupturi cromozomiale.

Aneuploidia poate fi de tip hipodiploid (1, 3, 6, 8, 16, 28, 33, 54) sau hiperdiploid (3, 14, 24, 25, 29, 50, 62). Pseudodiploidia a fost arareori observată (46). Tendinţa spre hipodiploidie a eritroleucemiei, rar observată în cancerul uman, reprezintă însă una din trăsăturile caracteristice ale leucemiei mieloblastice acute (fig. 35).

Poliploidia a fost constatată în alte observaţii (14, 16, 25, 37), iar incidenţa rupturilor ciomozomiale pare considerabil crescută (14, 16, 62). Cromozomii markeri nu apar frecvent şi sînt necaracteristici. Au fost semnalaţi cromozomi inelari (6), acrocentrici lungi şi cromozomi „minute" (3).

5.4. **Metaplazia mieloidă**

Numărul publicaţiilor referitoare la constituţia citogenetică a metaplaziei mieloide este relativ mic, din cauza unor dificultăţi tehnice considerabile care fac dificilă obţinerea unor metafaze de calitate satisfăcătoare. Datele existente se pot încadra în următoarele categorii:

a) *Metaplazie mieloidă cu cromozomi normali.* Prezenţa unor cariotipuri normale a fost remarcată de numeroşi autori (11, 13, 26,

Scanned with OKEN Scanner

38, 48, 66). Nu au fost observate diferențe semnificative între simptomatologia acestor bolnavi și simptomatologia bolnavilor care prezintă anomalii cromozomiale.

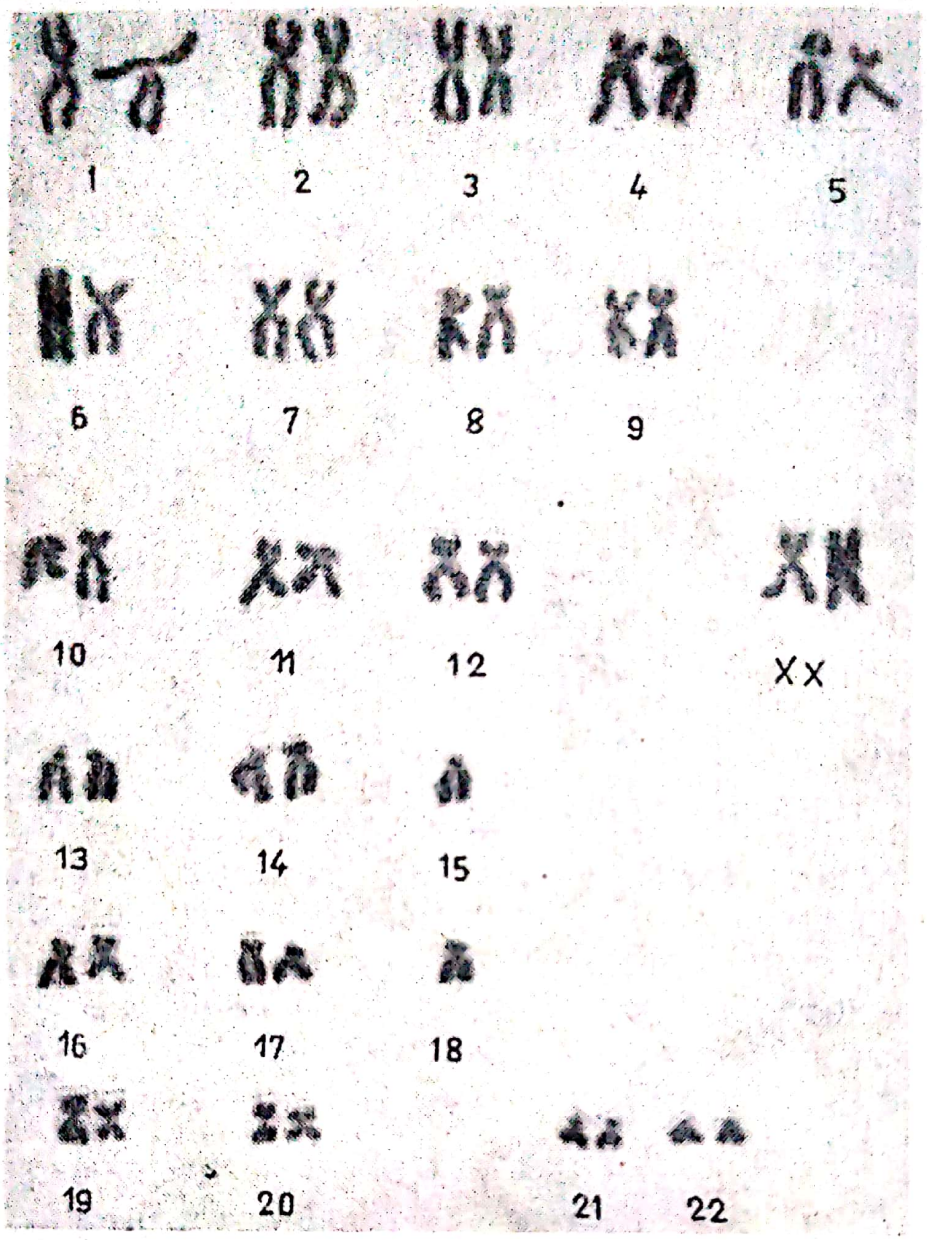


Fig. 35 — Cariotipul unei celule hipodiploide (47, XX, —D, — E) într-un caz de eritroleucemie.

b) *Metaplazie mieloidă cu monosomie* C. Existența unor cazuri de metaplazie mieloidă cu monosomie C a fost semnalată în numeroase publicații (18, 20, 38, 66). Bazat pe frecvența relativ mare a acestei anomalii, Holden și colab. (18) au propus izolarea unei noi entități clinice: mielofibroza cu cariotip 45,—C. Realitatea acestui sindrom este însă discutabilă, deoarece afecțiuni mieloproliferative cu un tablou clinic complet diferit pot prezenta același cariotip (4). Une-

Scanned with OKEN Scanner

ori, monosomia C este însoțită de prezența unor cromozomi suplimentari în alte grupe (fig. 36).

c) *Metaplazia mieloidă cu trisomie* C. Trisomia unui cromozom din grupa C pare destul de frecventă în metaplazia mieloidă, ea fiind descrisă de Kiossoglou și colab. (26), Krogh Jensen (28), Sandberg și colab. (49) și Speed și Lawler (52).

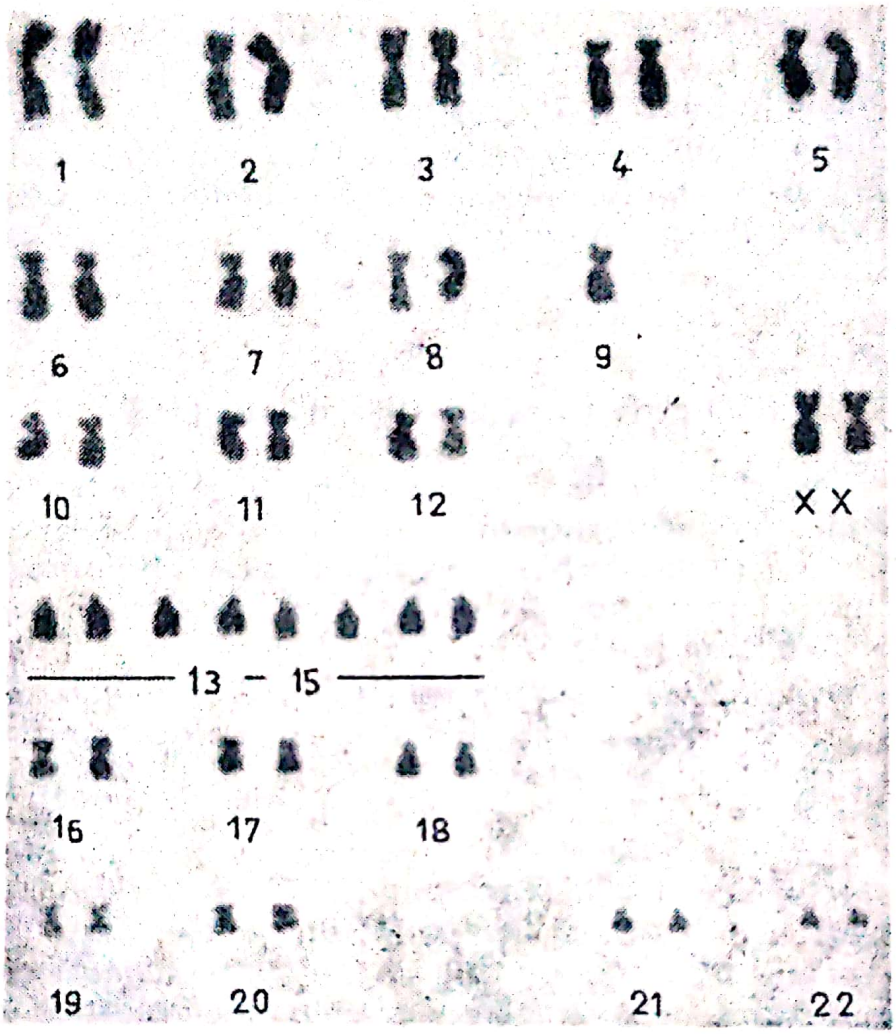


Fig. 36—Cariotipul unei celule hiperdiploide (47,XY, —C, +2D într-un caz de metaplazie mieloidă.

d) *Metaplazia mieloidă cu cromozom Philadelphia.* Bowen și Lee (2) și Khan și Martin (23) au publicat cazuri de metaplazie mieloidă Philadelphia-pozitivă. Semnificația lor este incertă, cu atît mai mult cu cît diagnosticul diferențial între metaplazia mieloidă și leucemia granulocitară cronică este adesea dificil.

e) *Metaplazia mieloidă cu cromozomi markeri.* Cromozomii markeri sînt întîlniți destul de frecvent, însă morfologia lor este adesea variabilă. A fost descrisă deleția brațelor scurte sau lungi ale unui

Scanned with OKEN Scanner

cromozom din grupa D (9, 23), prezența unui acrocentric mic derivat probabil dintr-un cromozom din grupa C (51), apariția unor metacentrici mici rezultați din ruptura brațelor lungi ale unui cromozom nr. 18 (35).

Anomaliile cromozomiale din mielosclerozã nu interesează numai celulele medulare, ci și celulele splenice, în care a fost observată prezența aneuploidiei cu cromozomi suplimentari în grupele C și D (41, 42).

Van Slyck și colab. (59) au demonstrat că în mielofibroza acută, proliferarea fibroblastică are numai un rol secundar. Astfel, în culturile de celule derivate din fibroblastele medulare au fost observate numai cariotipuri normale, în timp ce în mieloblaști s-a evidențiat o anomalie constantă, interpretată ca o translocație între cromozomii 1 și 3.

5.5. **Trombocitemia idiopatică**

Trombocitemia idiopatică, numită și trombocitemia esențială sau mieloză megacariocitară, este o afecțiune mieloproliferativă caracterizată prin trombocitoza din sîngele periferic, hiperplazia megacariocitară a măduvei și, în mai mică măsură, hiperplazia seriei granulocitare și eritroide.

Majoritatea cazurilor examinate au prezentat cariotipuri normale (17, 57). Anomaliile mai frecvent semnalate constau în prezența unor cromozomi suplimentari în grupa C (7, 47) și în apariția unor cromozomi de tip Philadelphia (7, 15, 57). Prezența anomaliilor cromozomiale a fost întîlnită cu deosebire în cazurile atipice — trisomia C fiind semnalată în cazurile de mieloză megacariocitară în care se indica posibilitatea evoluției spre mielofibroză, iar cromozomul Ph^1 — în cazuri cu un tablou sanguin sugestiv pentru leucemia granulocitară cronică sau leucemia mieloblastică acută (65).

5.6. **Sindroame mieloproliferative atipice**

În unele cazuri, natura exactă a sindromului mieloproliferativ nu a putut fi stabilită. O parte din acești pacienți au evoluat ulterior spre leucemii acute sau subacute. Cazurile examinate de Kiossoglou și colab. (26) și Winkelstein și colab. (64) prezentau trisomia unui cromozom din grupa C. O anomalie asemănătoare a fost observată la un pacient cu un sindrom mieloproliferativ atipic, ase-

Scanned with OKEN Scanner

mănător leucemiei granulocitare cronice. Într-un sindrom mieloproliferativ „preleucemic", Humbert și colab. (19) remarcă absența unui cromozom din grupa C. Polak și Zizka (43) descriu un sindrom mieloproliferativ atipic care a avut inițial aspectul unei reacții leucemoide, a continuat ca o eritremie acută și a sfîrșit ca o panmieloftizie. La examenul citogenetic s-a observat lipsa unui cromozom din grupa C, iar în faza terminală, un alt cromozom C era înlocuit printr-un cromozom inelar. Louwagie și colab. (32) au studiat un pacient cu mielosclerozâ, la care s-a dezvoltat ulterior o limfosarcomatoză. Examenul citogenetic a relevat prezența a două linii celulare: una normală, alta cu 48 de cromozomi, datorită prezenței unor cromozomi suplimentari în grupele C și D.

BIBLIOGRAFIE

1. BAIKIE A. G., JACOBS P. A., MC BRIDE J. A., TOUGH I. M. — *Brit. med. J.* 1961, *1*, 1 564.
2. BOWEN P ., LEE C.S.N. — *Bull J. Hopkins Hosp.*, 1963, *113*, 1.
3. CASTOLDI G., YAM L. T., MITUS W. J., CROSBY W. H. — *Blood*, 1968, *31*, 202.
4. CERVENKA J., KOULISCHER L. — Chromosomes in human cancer, Ch. Thomas Publisher, Springfield, 1973.
5. DAMESHEK W. — *Blood*, 1951, 6, 339.
6. DI GRADO F., TEXEIRO MENDENS F., SCHROEDER E. — *Lancet*, 1964, *ii*, 1 243.
7. DOUGAN L., WOODLIFF H. J., ONESTI P. — *Med. J. Austr.*, 1967, *1*, 62.
8. DYMENT P. G., MELNYK J., BRUBAKER C. A. — *Blood*, 1968, *32*, 997.
9. ENGEL W., MERKER H., SCHNEIDER G., WOLF U. — *Humangenetik*, 1968, 6, 335.
10. ERKMAN B., HAZLETT B., CROOKSTON J. H., CONEN P. E. — *Cancer* 1967, *20*, 1 318.
11. FORRESTER R. H., LOURO J. M. — *Ann. int. Med.*, 1966, 64, 622.
12. FRÜHLING J., HENRY J. — *Europ. J. Cancer*, 1967, *3*, 193.
13. GOH K., SWISHER S. N. — *Ann. int. Med.*, 1964, *61*, 609.
14. HEATH C. W. JR., BENNETT J. M., WHANG-PENG J. și colab. — *Blood*, 1969, *32*, 453.
15. HEATH C. W. JR., MOLONEY W. C. — *Cancer*, 1965, *18*, 1 495.
16. HEATH C. W. JR., MOLONEY W. C. — *Blood*, 1965, *26*, 471.
17. HERRMANN R. P., GALLON W., JACKSON J. M., WOODLIFF H. J. — *Aust. N. Z. J. Med.*, 1973, *3*, 486.
18. HOLDEN J. D., GARCIA F. U., SAMUELS M. și colab. — *Amer. J. clin. Path.*, 1971, *55*, 573.
19. HUMBERT R. J., HATHAWAY W. D., ROBINSON A. și colab. — *Brit. J. Haemat.*, 1971, *21*, 705.
20. JACKSON J. F., HIGGINS L. C. — *Arch. int. Med.*, 1967, *119*, 403.
21. KAY H. E. M., LAWLER S. D., MILLARS R. E. — *Brit. J. Haemat.*, 1966, *12*, 507.

Scanned with OKEN Scanner

6. INSUFICIENȚELE MEDULARE

Unele afecțiuni hematologice neleucemice prezintă o tendință marcată de transformare malignă. Acest grup heterogen cuprinde atît citopeniile constituționale (anemia Fanconi, trombopenia amegacariocitară, anemia Diamond-Blackfan, agranulocitoza Kostmann, sidromul Aldrich, ataxia-teleangiectazia), cît și o categorie de afecțiuni imprecis definite, incluse în grupul „stărilor preleucemice" (22) sau al mielodisplaziilor (25). După Nowell (22), în categoria *stărilor preleucemice* sînt incluși bolnavi „la care nu se poate face un diagnostic definit de leucemie, dar care, după cum o demonstrează experiența clinică, pot evolua ulterior spre o leucemie evidentă". Stările preleucemice includ atît sindroamele mieloproliferative (policitemia vera, mielofibroza, metaplazia mieloidă), cît și anemiile rezistente la tratament, leucopeniile sau pancitopeniile, în care tabloul medular este atipic, adesea cu multe forme primitive. *Mielodisplaziile* sînt definite de Rowley și colab. (25) ca un grup de afecțiuni în care există o tulburare a formării uneia sau mai multor linii celulare majore (eritroidă, granulocitară, megacariocitară), dar în care simptomele nu sînt caracteristice pentru o stare neoplazică, mieloproliferativă sau leucemică, trăsăturile clinice fiind adesea intermediare sau tranziționale între aceste afecțiuni. În cele ce urmează, vom prezenta numai modificările cromozomiale observate în insuficiențele medulare cîștigate, citopeniile constituționale făcînd obiectul unui alt capitol.

Diferitele forme de anemii care au fost investigate cuprind anemia pernicioasă, anemia aplazică, anemia sideroacrestică, anemia idiopatică cîștigată. Unele cazuri de anemie se transformă în leucemii (21, 22, 28), în timp ce altele nu prezintă această tendință evolutivă (5, 6, 17). S-a sugerat că examenul citogenetic ar putea servi drept criteriu de diagnostic diferențial între anemiile „adevărate" și preleucemii.

În *anemia pernicioasă* a fost remarcat, de multă vreme, aspectul delicat, filiform și despiralizat al cromozomilor. Anomaliile numerice sînt frecvente, mai ales sub forma hipodiploidiei. Pierderea cromozo-

Scanned with OKEN Scanner

milor din metafazele hipodiploide interesează toate grupele de cromozomi, cu o anumită preferință pentru cromozomii mici (grupa G). Pierderea acestor cromozomi ar putea fi consecința poziției particulare a cromozomilor la nivelul fusului în decursul diviziunii, sau a unei tendințe crescute spre fragmentare (2). Aberațiile structurale au fost semnalate de numeroși autori (1, 2, 9, 12, 14, 18, 20, 24); ele constau în rupturi și lacune cromatidice, fragmentări multiple, fragmente acentrice, translocații și cromozomi dicentrici. Este posibil ca lipsa vitaminei B_{12} să producă o sinteză imperfectă a acizilor nucleici, care ar răspunde de apariția alterațiilor morfologice observate. În acest sens, menționăm faptul că antagoniștii acidului folic pot provoca anomalii cromozomiale asemănătoare celor observate în manifestările patologice datorite deficitului de aport sau de utilizare a acidului folic (2, 12, 26).

Anemia pernicioasă este frecvent asociată cu proliferările neoplazice. Se discută posibilitatea ca prezența leziunilor cromozomiale să confere cariotipului un caracter de instabilitate și să constituie un teren favorabil pentru evoluția neoplaziilor (2).

O mare parte din bolnavii cu *anemie aplastică și refractară* nu prezintă modificări cromozomiale, exceptînd creșterea moderată a incidenței celulelor poliploide (5, 6, 17). Rowley și colab. (25) au observat un caz în care majoritatea celulelor medulare aveau 45 de cromozomi, datorită pierderii unui cromozom din grupa C. Van den Berghe (27) a studiat 3 bolnavi care prezentau o deleție a brațului lung a unui cromozom nr. 5. Deleția părea interstițială, cu afectarea benzilor 5q12–5, 5q21–3 și nu era însoțită de translocația segmentului deletat. În cazul de anemie aplastică publicat de Erdogan și colab. (7) a fost evidențiată o trisomie 21. Unul din pacienții examinați de noi prezenta o trisomie 22 (fig. 37).

În *anemia idiopatică sideroacrestică* a fost raportată prezența trisomiei C (10, 25). În cazul studiat de Jonasson și colab. (10), cromozomul suplimentar aparținea perechii nr. 8. Freireich și colab. (8) au publicat 3 cazuri de anemie refractară asociată cu trombocitopenie și hiperplazie granulocitară medulară, în care celulele medulare aveau 45 de cromozomi (45,–C). Doi din acești bolnavi au decedat ulterior cu leucemie acută mielomonocitară. Meisner și colab. (19) au studiat o bolnavă cu anemie și pancitopenie care prezenta o translocație echilibrată între brațele lungi ale cromozomilor B și G /46,XX,t(Bq—; Gq+)/. Existența trisomiei C a fost observată la un pacient în faza preleucemică (cu aspectul unei pancitopenii) a unei leucemii acute mieloide (11), la un pacient cu pancitopenie și la altul cu granulocitopenie și trombocitopenie (4). Într-un caz de pan-

Scanned with OKEN Scanner

citopenie cu evoluție fatală au fost observate constricții secundare accentuate ale extremităților distale ale unui cromozom nr. 2 (23). La bolnavii pancitopenici care au evoluat ulterior spre leucemie,

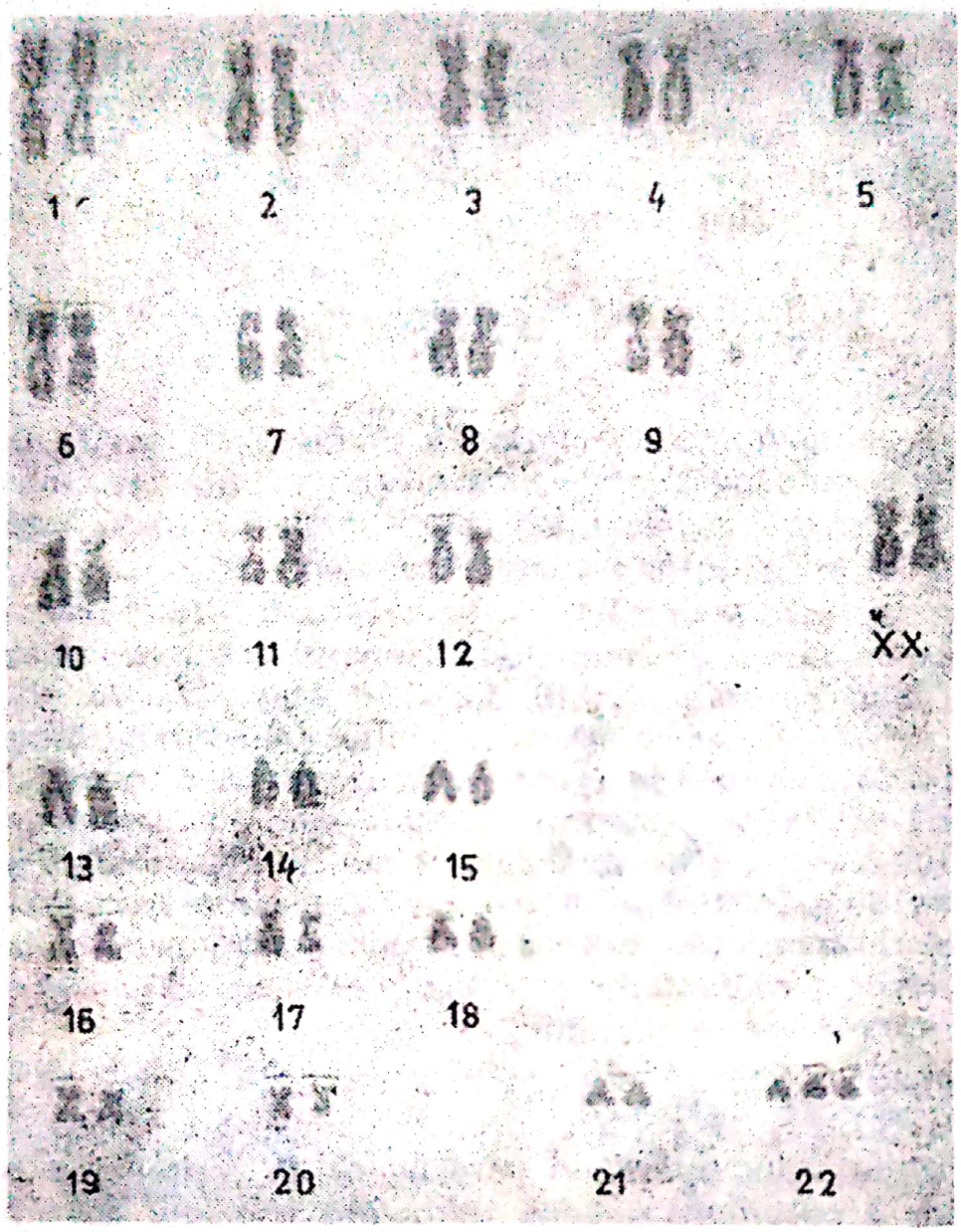


Fig. 37 — Trisomie 22 (47,XX,+22) într-un caz de anemie aplastică.

Nowell (22) observă prezența unor clone hipodiploide, datorită pierderii unor cromozomi din grupele B, C, D și E și, mai rar, apariția unor modificări structurale (cromozomi „minute"). Jensen și Philip (13, 15, 16) acordă o mare importanță aspectului cromatinei, considerînd că prezența unor cromozomi cu contur estompat, imprecis definit, indică iminența transformării leucemice.

Scanned with OKEN Scanner

În stadiul actual al cunoștințelor, nu poate fi încă formulată o concluzie asupra semnificației modificărilor cromozomiale observate în citopenii. Cadrul lor este insuficient conturat, iar diagnosticul depinde de interpretările — adesea contradictorii — ale diferiților autori. Este de așteptat ca tehnicile de bandare, recent introduse, să permită o identificare exactă a cromozomilor afectați. Pe de altă parte, dacă se va confirma faptul că transformarea leucemică interesează numai cazurile de pancitopenie care prezintă anomalii cromozomiale (21, 22), se va putea trece la un tratament diferențiat al pancitopeniilor, în funcție de potențialul lor evolutiv.

BIBLIOGRAFIE

1. BOTTURA C., COUTINHO V. — *Blut*, 1968, *16*, 193.
2. CASTOLDI G. L., SCAPOLI G. L., DALLAPICCOLA B., SPANEDDA R. — *Nouv. Rev. Franç. Hémat.*, 1969, *9*, 769.
3. CERVENKA J., KOULISCHER L. — Chromosomes in human cancer, Ch. Thomas Publisher Springfield, Ill., 1973.
4. DE LA CHAPELLE A., SCHRÖDER J., VUOPIO P. — *Clin. Genet.*, 1972, *3*, 470.
5. COBO A., LISKER R., SOLEDAD CORDOVA M., PIZZUTU J. — *Acta haemat.*, 1970, *44*, 32.
6. COBO DE GUTIÈRREZ A., LISKER R., URIBE M. — *Rev. Invest. clin. (Méx.)*, 1974, *26*, 153.
7. ERDOGAN G., AKSOY M., DINKOL K. — *Acta haemat.*, 1967, *37*, 137.
8. FREIREICH E. J., WHANG J., TJIO J. H. și colab. — *Clin. Res.*, 1964, *12*, 284.
9. HEATH C. W. JR. — *Blood*, 1966, *27*, 800.
10. JONASSON J., GAHRTON G., LINDSTEN J. și colab. — *Blood*, 1974, *43*, 557.
11. KHAN M. H. — *Humangenetik*, 1972, *16*, 323.
12. KIOSSOGLOU K. A., MITUS W. J., DAMESHEK W. — *Blood*, 1965, *25*, 662.
13. KROGH JENSEN M. — *Acta med. scand.*, 1968, *183*, 535.
14. KROGH JENSEN M., MOLLER A. I. — *Acta med. scand.*, 1967, *181*, 571.
15. KROGH JENSEN M., PHILIP P. — *Scand. J. Haemat.*, 1970, *7*, 330.
16. KROGH JENSEN M., PHILIP P. — *Acta med. scand.*, 1973, *193*, 353.
17. LISKER R., COBO DE GUTIÉRREZ A., VELÁZQUEZ-FERRARI M. — *Cancer*, 1973, *31*, 509.
18. MATSANIOTIS N., KIOSSOGLOU K. A., MAOUNIS F., BASTI-MACUNI B. — *Acta haemat.*, 1968, *39*, 29.
19. MEISNER L. F., INHORN S. L., CHUPREVICH T. W. — *Amer. J. clin. Path.*, 1973, *60*, 435.

Scanned with OKEN Scanner

7. MODIFICĂRI CROMOZOMIALE ÎN LEUCEMII

7.1. Leucemia granulocitară cronică

7.1.1. Introducere

În anul 1960, Nowell și Hungerford (158, 159) au evidențiat existența unui cromozom acrocentric foarte mic în celulele sanguine provenite de la doi bolnavi cu leucemie granulocitară cronică. Descoperirea lui Nowell și Hungerford a fost imediat confirmată de Baikie și colab. (8), care au propus ca markerul să fie denumit Philadelphia sau Ph^1, conform sistemului de nomenclatură adoptat la Denver, care recomandase ca fiecare cromozom marker să fie etichetat cu primele două litere ale orașului în care s-a făcut descoperirea.

7.1.2. Identitatea cromozomului Ph^1

Din punct de vedere *morfologic* este vorba despre un cromozom aparținînd grupei G, a cărui talie este redusă la aproximativ jumătate față de dimensiunile normale, datorită deleției segmentelor distale ale brațelor sale lungi (fig. 38). S-a crezut mult timp că cromozomul Ph^1 ar aparține perechii 21. Cercetări autoradiografice (50), precum și observațiile efectuate de Caspersson și colab. (30) cu metoda de bandare cu quinacrină mușstar îl identifică însă cu precizie ca un membru al perechii 22 (22q—).

Soarta segmentelor desprinse de pe cromozomul Ph^1 a putut fi trasată numai recent, cu ajutorul noilor tehnici de bandare a cromozomilor. Rowley (193) a constatat prezența unei benzi adiționale la extremitatea terminală a brațului lung a unui cromozom nr. 9. Întrucît materialul adițional era aproximativ egal cu segmentul care lipsea de pe cromozomul Ph^1, autoarea a sugerat posibilitatea unei *translocații* între brațul lung al unui cromozom nr. 22 și brațul lung al unui cromozom nr. 9, rezultînd un cromozom 9q+. Faptul că în

Scanned with OKEN Scanner

cazurile de leucemie granulocitară cronică Ph¹-negativă cromozomul 9q+ nu a putut fi detectat demonstrează că materialul adițional de pe cromozomul 9 provine de pe cromozomul 22 (92). Translocația dintre cromozomii 22 și 9 reprezintă cea mai frecventă modificare cito-

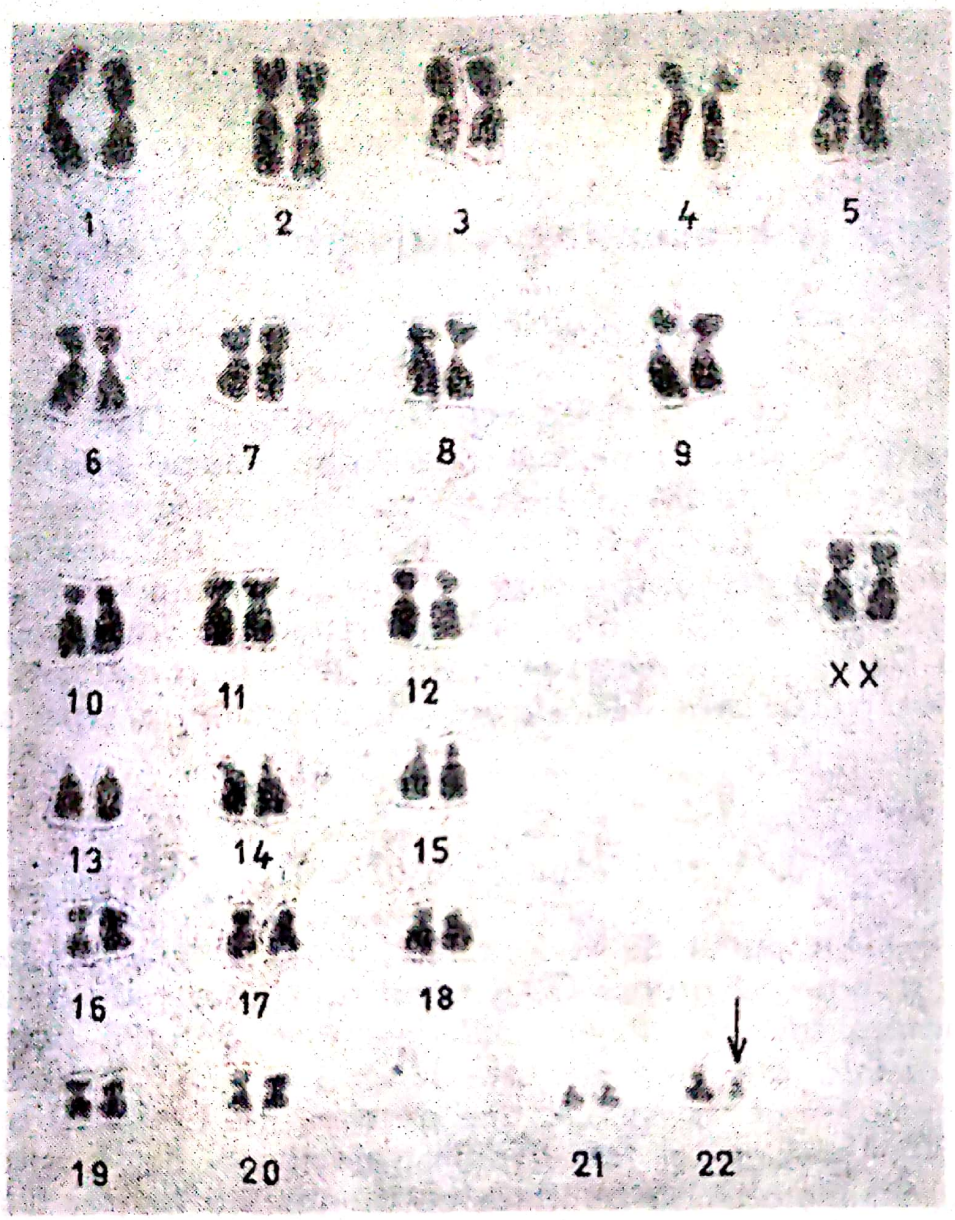


Fig. 38 — Cromozomul Philadelphia (Ph) într-un caz de leucemie granulocitară cronică (46,XX,22q-).

genetică din leucemia granulocitară cronică (185). Au fost observate însă și situații în care materialul desprins de pe cromozomul 22 a fost translocat pe cromozomul nr. 2 (86), nr. 11 (153), nr. 13 (87), nr. 17 (47), nr. 19 (66), nr. 21 (101) sau pe celălalt cromozom 22 (60). În sfîrșit, au fost descrise cazuri cînd segmentul deletat de pe cromozomul 22 nu a putut fi detectat pe nici un alt cromozom, fiind probabil pierdut din celulă (145). Tabloul clinic și evoluția bolna-

Scanned with OKEN Scanner

vilor care prezintă aceste translocații neobișnuite au fost asemănătoare cu ale pacienților avînd tipul standard de translocație (9; 22). Se pare de aceea că deleția cromozomului 22 are o importanță mai mare decît tipul de translocație asociat cu formarea cromozomului Ph^1.

Porțiunea deletată a cromozomului Ph^1 este de obicei separată de cromozomul 22 în regiunea 22q12, iar translocația pe cromozomul 9 are loc în regiunea 9q34 (241). Translocația pare a fi echilibrată, dar metodele existente nu pot exclude mutația sau pierderea unor gene.

7.1.3. Specificitatea cromozomului Ph^1

Spre deosebire de anomaliile cromozomiale evidențiate în alte forme de leucemii, limfoame maligne sau cancere, cromozomul Ph^1 este caracteristic leucemiei granulocitare cronice. Specificitatea sa este relevată de următoarele argumente: a) anomalii de acest tip nu apar decît excepțional în mod constituțional, la indivizi sănătoși. Astfel, Ilbery și colab. (100) și Dent și colab. (35) notează prezența unor cromozomi de tip Ph^1 în cazul unor mongoloidieni cu simptome clinice atenuate, iar Weiner (234) găsește cromozomi Ph^1 la mai mulți membri sănătoși dintr-o familie cu o incidență înaltă a leucemiei granulocitare cronice; b) cromozomul Ph^1 nu este întîlnit în alte sindroame mieloproliferative, excepțiile fiind foarte rare. Semnificația cromozomului Ph^1 în aceste cazuri va fi discutată ulterior; c) cromozomul Ph^1 este întîlnit în majoritatea cazurilor de leucemie granulocitară cronică; d) cromozomul Ph^1 este întîlnit numai în măduvă și în celulele derivate din ea, lipsind din celelalte celule somatice, ca limfocitele și fibroblastele; e) faptul că cromozomul Ph^1 a fost uneori prezent înainte de declanșarea clinică a bolii (107) infirmă ipoteza lui Schöyer (211), după care el ar reprezenta numai consecința afecțiunii; f) în cuplurile de gemeni monozigoți, numai individul bolnav prezintă cromozomul Ph^1, ceea ce demonstrează că anomalia este postzigotică, cîștigată, și nu reprezintă un defect ereditar al cromozomului (12, 72, 73, 103, 244).

7.1.4. Tipurile de celule în care se găsește cromozomul Ph^1

Tough și colab. (225) și Trujillo și Ohno (277) au adus dovezi indirecte care sugerează că cromozomul Ph^1 este întîlnit nu numai în linia granulocitară (mieloblaști și/sau promielocite), ci și în eritroblaști și megacariocite. În sprijinul acestei ipoteze, Bernard și Tanzer (23) aduc următoarele argumente: în cazurile în care măduva

Scanned with OKEN Scanner

este populată mai ales de eritroblaşti, există totuşi un mare procent de celule medulare care conţin cromozomul Ph^1; există un paralelism între numărul de megacariocite şi numărul de mitoze poliploide conţinînd mai mulţi cromozomi Ph^1. Rastrick şi colab. (186) au cultivat măduva osoasă în prezenţa Fe^{59} şi Fe^{55}. Examenul autoradiografic a arătat că numai celulele eritroide erau marcate, în timp ce celulele seriei mieloide şi megacariocitare nu au încorporat izotopul. Cromozomul Ph^1 a fost evidenţiat atît în metafazele marcate, cît şi în cele nemarcate, ceea ce demonstrează că el este prezent şi în celulele eritroide.

Trujillo şi Ohno (227) şi Whang şi colab. (236) admit pe baza acestor date că cromozomul Ph^1 ar lua naştere într-un precursor celular comun al seriilor eritroide, granulocitare şi megacariocitare. O analiză făcută de Sandberg şi colab. (205) arată însă că pe baza acestor date nu se poate susţine fără echivoc ipoteza originii unicelulare a acestor serii.

Proporţia celulelor sanguine purtătoare de cromozomi Ph^1 este variabilă, existînd uneori, în decursul perioadelor de remisiune, un decalaj între numărul redus sau chiar absenţa celulelor Ph^1-pozitive din sînge şi proporţia lor ridicată din măduvă, ceea ce arată caracterul incomplet al remisiunilor din leucemia granulocitară cronică.

7.1.5. Originea clonală a leucemiei granulocitare cronice

Problema originii clonale sau multicelulare are o importanţă fundamentală pentru patogeneza tumorală. În cazul leucemiei granulocitare cronice, această problemă poate fi abordată prin studiul pacienţilor care prezintă în mod constituţional mai multe linii celulare (mozaic) sau al cazurilor în care cromozomii perechii 22 diferă între ei prin anumite caractere morfologice. Fitzgerald şi colab. (57) au examinat un caz de leucemie ganulocitară cronică survenită la un pacient care prezenta un mozaicism al cromozomilor sexuali (XY/XXY). Cromozomul Ph^1 a fost evidenţiat numai în linia 46, XY, ceea ce înseamnă că celulele liniei 47, XXY nu au fost afectate de procesul leucemic. Un alt bolnav, studiat de Moore şi colab. (148), prezenta un mozaicism constituţional 46, XY/47, XYY; cromozomul Ph^1 a fost observat numai în celulele liniei 46, XY. În sfîrşit, prin studiul unui pacient care prezenta un cromozom Ph^1 satelitat, s-a arătat că aberaţia afecta întotdeauna acelaşi cromozom 22 (64). Toate aceste date demonstrează că leucemia granulocitară cronică are o origine clonală. Cromozomul Ph^1 poate avea fie o origine maternă, fie o origine paternă (65).

Scanned with OKEN Scanner

7.1.6. Anomalii cromozomiale în decursul transformării blastice a leucemiei granulocitare cronice

În decursul fazei de stare a leucemiei granulocitare cronice, cromozomul Ph^1 reprezintă, de obicei, singura anomalie decelabilă. Transformarea blastică este adesea însoțită sau precedată de modificări cromozomiale suplimentare (75). Urmărirea seriată a unor cazuri de leucemie granulocitară cronică a arătat că transformările cariotipului se fac sistematizat, fundamentîndu-se astfel noțiunea de „evoluție clonală" (17, 18, 77, 78, 134). Anomaliile cromozomiale constau mai ales în modificări numerice, de obicei în sensul hiperdiploidiei și, mai rar, în aberații structurale (132). Se pare că fazele inițiale ale evoluției cariotipice implică pierderi și duplicări în grupe variate de cromozomi (174), în timp ce în fazele evolutive ulterioare sînt afectate categorii cromozomiale specifice, ceea ce sugerează că polimorfismul citogenetic inițial este treptat îngustat (175).

De Grouchy și colab. (77–79) propun 7 modele principale de evoluție clonală în leucemia granulocitară cronică:

Modelul 1. Duplicarea cromozomului Ph^1. Duplicarea cromozomului Ph^1 este una din cele mai frecvente manifestări ale evoluției clonale (220, 243), care poate coincide cu transformarea blastică sau o poate preceda. În unele cazuri, duplicarea cromozomului Ph^1 reprezintă un fenomen izolat (45, 48, 83, 109, 154, 215). Alteori, ea este însoțită de alte modificări cromozomiale, cum ar fi achiziționarea de cromozomi suplimentari în grupa C (38, 40, 71, 105, 237, 242), D (36, 83) sau F (177). Cei doi cromozomi Ph^1 pot prezenta o translocație reciprocă, rezultînd un cromozom metacentric mic, a cărui identitate a putut fi clarificată numai cu ajutorul tehnicilor de bandare (240).

La unii pacienți, duplicarea cromozomului Ph^1 se asociază cu un tablou clinic particular, caracterizat prin adenopatii considerabile și infiltrația blastică a organelor. Studiile citogenetice au arătat că modificările cromozomiale sugestive pentru transformarea blastică (duplicarea cromozomului Ph^1, însoțită uneori de alte anomalii) pot apărea inițial în splină (147, 163, 245). Faptul că acutizarea poate avea o origine extramedulară, măduva fiind colonizată ulterior cu elemente blastice provenite din splină și ganglioni, are importante implicații terapeutice, impunînd splenectomia precoce la acești pacienți.

Modelul 2. Achiziționarea de cromozomi supranumerari. Un model simplu de evoluție clonală constă în achiziționarea unui cromozom supranumerar, care aparține de obicei grupei C (fig. 39), mai rar grupei D (196). Acest model de evoluție clonală nu a putut fi corelat cu un anumit tip de evoluție clinică (79).

Scanned with OKEN Scanner

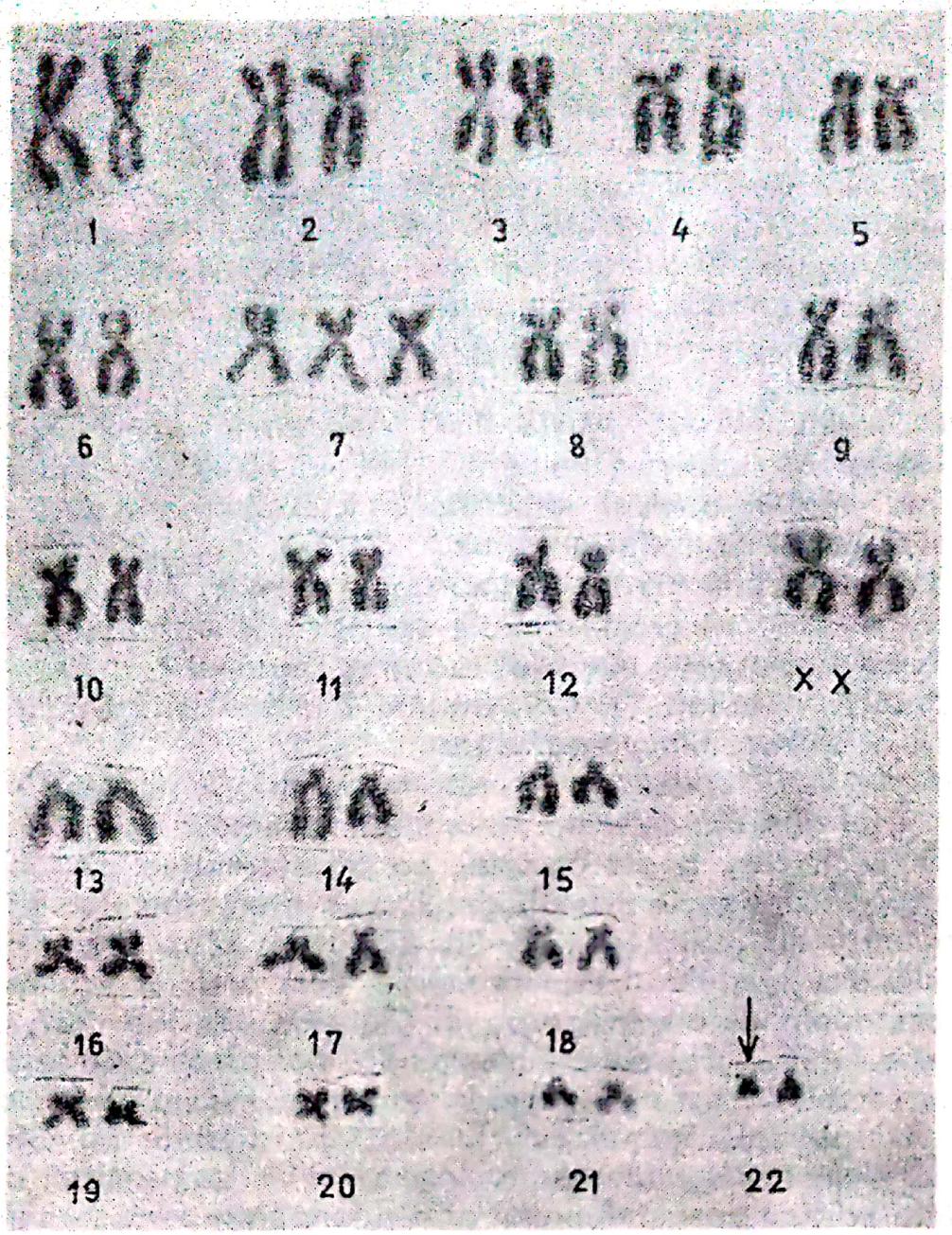


Fig. 39 — Evoluție clonală în leucemia granulocitară cronică. Alături de prezența cromozomului Ph^1 se observă existența unui cromozom suplimentar în grupa C (47,XX,+8,22q-).

Modelul 3. Achiziționarea și duplicarea cromozomilor supranumerari. Achiziționarea succesivă a unor cromozomi supranumerari, urmată de duplicarea lor, constituie unul din cele mai importante modele de evoluție clonală. Cea mai frecventă situație este reprezentată de disomia cromozomului Ph^1 și prezența unor cromozomi suplimentari în grupa C (71, 105, 112, 149, 237). Tot în această grupă sînt cuprinse cazurile în care, pe lîngă duplicarea cromozomului Ph^1, se observă un exces de cromozomi D (36, 83, 128) sau F (177). Une-

Scanned with OKEN Scanner

ori apar cromozomi suplimentari aparținînd unor grupe diferite, ceea ce duce la o mare complexitate a cariotipului (15, 48, 68, 116, 165, 177, 191, 215, 237).

Modelul 4. Pierderea de cromozomi. Pierderea cromozomului Y reprezintă exemplul cel mai caracteristic pentru acest model (4, 16, 41, 44, 76, 94, 132, 214, 217, 222, 225). Absența cromozomului Y este restrînsă la celulele de origine medulară, celelalte celule avînd un complement cromozomial normal (16, 173). Pacienții care prezintă această anomalie au, în mod caracteristic, o evoluție clinică și hematologică atenuată, chiar în absența tratamentului. Mecanismul pierderii cromozomului Y și modul în care această pierdere influențează comportamentul celulelor leucemice nu este cunoscut.

Modelul 5. Achiziționarea și pierderea de cromozomi. În unele cazuri, achiziționarea progresivă a unor cromozomi se însoțește de pierderea altora. Grupele cele mai frecvent afectate sînt G, C, E și D (213, 229).

Modelul 6. Rearanjamente structurale. Cromozomul Ph^1 reprezintă anomalia structurală cea mai caracteristică pentru leucemia granulocitară cronică. Ocazional, pot apărea însă și alți cromozomi markeri, fie ca anomalii izolate, fie în cadrul unor modificări complexe ale cariotipului. Situația cea mai frecvent întîlnită este reprezentată de pierderea unui cromozom nr. 17 și achiziționarea unui cromozom suplimentar în grupa C (11, 46, 166, 218, 219). Cu ajutorul tehnicilor de bandare s-a demonstrat că supranumerarul din grupa C este de fapt un izocromozom alcătuit din brațele lungi ale cromozomului nr. 17 care lipsește i(17q) (137). Markerul i(17q) apare în jumătate din cazurile de leucemie granulocitară cronică, care prezintă fenomene de evoluție clonală.

Fără a fi excepțională, apariția cromozomilor markeri de alte tipuri reprezintă totuși un eveniment relativ rar (95, 115, 150, 154). Modul de apariție a acestor cromozomi nu este precizat, dar se speră că noile tehnici de bandare vor putea elucida constituția și semnificația lor.

Modelul 7. Poliploidizarea. Poliploidizarea este un fenomen observat mai ales în tumorile solide și în leucemiile acute (188). În leucemia granulocitară cronică, poliploidizarea a fost semnalată numai ocazional și nu pare să joace un rol deosebit.

Mecanismul de apariție a acestor anomalii nu este precizat. Pedersen (171, 172) presupune că duplicarea cromozomului Ph^1 ar fi consecința unei tendințe speciale la nondisjuncție a acestui cromozom, iar Schroeder și Bock (212) sugerează că apariția cromozomilor adiționali în celelalte grupe ar fi de asemenea determinată de nondisjuncții repetate. După Lejeune (135), este însă mai plauzibilă

Scanned with OKEN Scanner

ipoteza unei endoreduplicări selective a unuia sau a cîtorva cromozomi din genom. Este posibil ca prezența cromozomului Ph¹ să condiționeze o instabilitate cariotipică și să antreneze apoi apariția unor modificări cromozomiale suplimentare printr-un mecanism de „interacțiune cromozomică" (133).

Semnificația evoluției clonale în leucemia granulocitară cronică nu este încă clarificată, discutîndu-se următoarele posibilități (13, 77):

a) Evoluția clonală este un epifenomen fără nici o semnificație. Împotriva acestei ipoteze pledează însă evoluția sistematizată a cariotipurilor, precum și tendința la transformare acută a cazurilor care prezintă evoluție clonală.

b) Evoluția clonală este consecința chimioterapiei. Această explicație este însă infirmată de observațiile efectuate asupra pacienților netratați.

c) Evoluția clonală este urmarea instabilității cariotipurilor Ph¹-pozitive și reflectă tendința de realizare a unui nou echilibru în genom.

d) Evoluția clonală este un proces care duce la transformarea blastică.

Majoritatea autorilor susțin ultimele două interpretări, iar studiul unor serii mari de pacienți a demonstrat că prognosticul la bolnavii Ph¹-pozitivi care prezintă modificări cromozomiale suplimentare este mai nefavorabil decît la pacienții fără asemenea modificări (237). Există însă și situații în care instalarea evoluției clonale nu a fost urmată de apariția crizei blastice (143, 165, 176, 221).

Transformarea acută a leucemiei granulocitare cronice pare să aibă o *origine monoclonală*. Această ipoteză a fost sugerată de Motomura și colab. (152), care au observat că într-un caz de leucemie granulocitară cronică în care în celulele medulare existau două clone celulare (45,X,Ph¹/46,XY,Ph¹) datorită pierderii unui cromozom Y, celulele variante dezvoltate după instalarea crizei blastice derivau exclusiv din clona 46,XY,Ph¹.

7.1.7. Semnificația cazurilor de leucemie granulocitară cronică Ph¹-negative

Existența unor cazuri de *leucemie granulocitară cronică Ph¹-negative* este în prezent bine documentată. Incidența lor este variabilă în funcție de statistici, cifra reală nedepășind probabil 2–3% din totalul cazurilor (79). Pacienții Ph¹-negativi au niveluri serice mai ridicate ale muramidazei (178), răspund mai slab la tratament și au o durată medie de supraviețuire mai scurtă decît pacienții Ph¹-pozitivi

Scanned with OKEN Scanner

(122, 224, 237). Intervalul dintre data stabilirii diagnosticului și apariția crizei blastice este de 10 luni la pacienții Ph^1-negativi și de 22,5 luni la pacienții Ph^1-pozitivi (229). Whang-Peng și colab. (237) presupun că tipurile de leucemie Ph^1-negative ar avea etiologii diferite sau ar fi chiar boli diferite, deși tabloul lor hematologic este identic.

Tot Ph^1-negative sînt și majoritatea *leucemiilor infantile* (28, 84, 91, 187, 210, 237), în care apar anomalii cromozomiale nesistematizate (187, 232). S-a propus, pe baza unor particularități clinice, hematologice (frecvența crescută a manifestărilor hemoragice, rezistența la tratamentul cu busulfan) și a unei evoluții deosebite, mai acute, ca leucemiile infantile să fie considerate drept o entitate separată, deosebită de leucemiile adulților. Remarcînd faptul că în leucemia granulocitară cronică infantilă sînt afectate toate elementele medulare, cu predominanța trăsăturilor monocitoide, Altman și colab. (2) cred că această afecțiune ar trebui considerată ca o variantă a leucemiei mielomonocitare.

7.1.8. Semnificația prezenței cromozomului Ph^1 în alte afecțiuni decît leucemia granulocitară cronică

Prezența cromozomilor Ph^1 a fost descrisă în leucemii acute mieloblastice (110, 111, 113, 117, 120, 141, 150, 239), leucemii acute limfoblastice (184), eritroleucemii (31, 93, 102), metaplazie mieloidă (109, 155) și alte sindroame mieloproliferative (88). Se pare că majoritatea cazurilor de leucemie acută mieloblastică Ph^1-pozitive au fost precedate de o fază intermediară de leucemie granulocitară cronică, care a trecut însă neobservată, fiind scurtă și asimptomatică (240). Dacă nu există nici un semn evocator de leucemie granulocitară cronică, se ridică posibilitatea ca procesul leucozic acut să fi atins clona Ph^1-pozitivă preexistentă înainte ca proliferarea granulocitelor să fi avut timp să se dezvolte (150).

Recent, Warburton și Bluming (233) au arătat însă, cu ajutorul tehnicii de fluorescență, că un cromozom de „tip Ph^1" evidențiat la un pacient cu anemie refractară era în realitate derivat din cromozomul Y. Acest fapt demonstrează că identitatea cromozomilor, etichetați drept „Philadelphia" în alte afecțiuni decît leucemia granulocitară cronică, trebuie reverificată cu metode moderne de bandare.

Constanța cu care este întîlnit cromozomul Ph^1 în leucemia granulocitară cronică și numărul extrem de mic al cazurilor cînd cromozomi de acest tip apar în alte afecțiuni, conferă anomaliei o excepțională *valoare diagnostică* (109, 157, 164).

Scanned with OKEN Scanner

7.1.9. Efectul terapiei asupra modificărilor cromozomiale

Tratamentul reduce incidența celulelor Ph^1-pozitive din sîngele periferic, reducere care evoluează paralel cu scăderea numărului de elemente mieloide imature. Substanțele utilizate în terapeutică nu par să determine dezvoltarea unor clone celulare noi. Ele selecționează însă variantele celulare mai puțin sensibile la acțiunea chimioterapicelor (167–171), iar instalarea rezistenței la terapie se asociază adesea cu ascendența unor linii celulare avînd caracteristici citogenetice particulare (27).

7.2. **Leucemia limfocitară cronică**

Există destul de puține date referitoare la constituția citogenetică a leucemiilor limfocitare cronice. Acest fapt se datorește rarității mitozelor obținute prin examenul direct al măduvei precum și indicelui mitotic scăzut din culturile de sînge periferic (26, 54). În plus, la examenul direct al măduvei se analizează mai ales celule din seriile mieloide, limfocitele din leucemia limfocitară cronică neavînd tendința de a intra în mitoză. Prelungirea duratei de cultivare a limfocitelor din sîngele periferic de la 3 zile la 6 zile crește indicele mitotic și permite obținerea unui număr apreciabil de metafaze analizabile (39, 67, 69).

Majoritatea bolnavilor studiați nu au prezentat anomalii cromozomiale (21). Deleția brațelor scurte ale unui cromozom nr. 21 (56, 81), anomalie denumită „Christchurch" sau „Ch^1", după localitatea în care s-a făcut descoperirea, pare să reprezinte un defect constituțional. Ea a fost observată și la membrii sănătoși ai familiei, iar prezența sa nu se limita la limfocite, ci apărea și în fibroblaști.

Studiind suma lungimilor cromozomilor G, Fitzgerald (52) constată că ea este semnificativ mai mică la bărbații leucemici decît la bărbații sănătoși; o diferență similară, dar nesemnificativă statistic, a fost întîlnită și la femei. Diferența de lungime este probabil determinată de un grad mai mare de condensare și spiralizare a tuturor sau a unora din cromozomii acrocentrici mici. Semnificația leziunii nu este cunoscută, dar condensarea cromozomilor ar putea modifica sau reprima acțiunea unor gene.

Modificările numerice ale cromozomilor, mai ales în sensul hiperdiploidiei, sînt destul de comune (21, 151). A fost descrisă și prezența unor cromozomi markeri (10, 11, 21, 39, 67, 151, 162, 196), dar ei par a fi lipsiți de specificitate.

Scanned with OKEN Scanner

Aplicarea tehnicilor de bandare (33) ar putea releva date noi, dar dificultăţile tehnice fac ca progresele în această direcţie să fie destul de lente.

7.3. **Leucemiile acute**

7.3.1. Introducere

Studiul comparativ al măduvei şi sîngelui periferic la bolnavii cu leucemii acute a arătat că în numeroase cazuri examenul direct al măduvei poate releva prezenţa unor anomalii cromozomiale, în timp ce în culturile de sînge periferic stimulate cu fitohemaglutinină (P.H.A.) se observă numai celule diploide (124, 206). Aceasta sugerează că numai limfocitele normale din sîngele periferic sînt stimulate şi intră în mitoză sub acţiunea PHA. Chiar dacă în limfocitele periferice stimulate apar anomalii, ele sînt de obicei nesistematizate şi reprezintă, probabil, consecinţa terapiei (3). Din acest motiv, examenul direct al măduvei osoase constituie metoda de elecţie în studiul hemopatiilor maligne.

7.3.2. Cariotipul în leucemiile acute

La 50–70% din pacienţii cu leucemii acute *nu se întîlnesc modificări cromozomiale* (53, 55, 80, 118, 208, 226, 239). Cifrele reale sînt probabil ceva mai mici, deoarece toate aceste statistici se bazează pe studii efectuate cu ajutorul tehnicilor clasice de coloraţie, iar aplicarea tehnicilor de bandare a detectat în unele cazuri prezenţa unor anomalii care nu fuseseră evidenţiate cu metodele convenţionale (59, 146). Semnificaţia cazurilor de leucemie acută cu cariotip diploid nu este cunoscută. După Mitelman şi Brandt (146), toate leucemiile acute ar începe cu un cariotip diploid, care ar progresa apoi spre aneuploidie printr-un proces de evoluţie clonală secvenţială. Pacienţii cu o predominanţă a metafazelor anormale s-ar găsi, astfel, într-un stadiu mai avansat al bolii decît pacienţii care prezintă celule diploide.

O problemă de o importanţă deosebită este *dacă la pacienţii care prezintă anomalii cromozomiale, aceste modificări au loc la întîmplare sau interesează în mod preferenţial anumiţi cromozomi.* Cercetările efectuate cu ajutorul tehnicilor clasice au dus la rezultate contradictorii. Sandberg şi colab. (208) nu au observat modificări cromozomiale preferenţiale, în timp ce în alte statistici a fost semnalată interesarea mai frecventă a cromozomilor din grupele C, G, D şi E

Scanned with OKEN Scanner

(1, 5, 6, 42, 55, 62, 74, 80, 90, 97, 99, 114, 118, 124, 156, 187, 197, 198, 216, 226, 235, 237 238).

Uneori se observă apariția de rupturi de tip cromatidic și cromozomic, cromozomi dicentrici, acentrici sau inelari (121). Prezența cromozomilor markeri a fost semnalată în mai multe publicații (58, 139, 146, 180), dar ei nu sînt des întîlniți și nu par a fi caracteristici. Aspectul cromozomilor din celulele leucemice este adesea estompat, cu cromatidele prost delimitate; între cromozomi se pot observa punți de cromatină. Aceste aspecte ar putea fi consecința unor dezordini în sinteza de ADN (123, 125) sau a proteinelor asociate.

Cercetările efectuate cu ajutorul *tehnicilor moderne de bandare*, deși limitate la un număr redus de pacienți (104, 131, 138, 146, 179, 192, 194, 199, 201), au relevat date extrem de interesante. Cea mai frecventă anomalie cromozomială se referă la cromozomii nr. 8. În majoritatea cazurilor este vorba de o trisomie a acestor cromozomi; alteori, unul din cromozomii perechii 8 este absent sau implicat în translocații. Anomaliile cromozomilor nr. 7 și 9 (trisomii, monosomii, deleții), 17 (izocromozom 17q) și 21 sînt mai rar întîlnite. În mod inconstant este pierdut un cromozom sexual (unul din cromozomii X la femeie sau cromozomul Y la bărbat).

Motivul afectării preferențiale a cromozomilor nr. 8 rămîne neexplicat. Este posibil ca această anomalie să fie determinată de prezența anumitor gene pe acest cromozom, după cum este posibil ca el să reprezinte sediul inserției sau activării unui virus specific sau a altui agent oncogen (195). Întrucît trisomia 8 a fost observată și în stări preleucemice (104), ea ar putea reprezenta prima etapă din lanțul de evenimente mutaționale al căror rezultat final este apariția cancerului. Pe de altă parte, este greu de explicat de ce nu toate cazurile de leucemie acută prezintă aceleași modificări cromozomiale. Prin analogie cu tumorile experimentale, se poate presupune că apariția unor aspecte cariotipice particulare este consecința acțiunii unor agenți etiologici diferiți, chiar dacă tabloul patologic final este identic (sau, cel puțin, în aparență identic).

Una din metodele utilizate pentru inducerea remisiunilor în leucemiile acute constă în iradierea cu doze supraletale a pacienților, urmată de transplantare de măduvă. Dacă pacientul și donorul au sexe diferite, soarta celulelor grefate poate fi urmărită prin examenul citogenetic al măduvei pacientului. Studiind un asemenea caz, Fialkow și colab. (51) au constatat că recăderea survenită la 2 luni după grefare era datorită transformării leucemice a celulelor medulare grefate. Cea mai plauzibilă explicație este reprezentată de transferul unui agent etiologic, probabil viral, din celulele gazdă (afectate de acțiunea iradierii?) în celulele donorului.

Scanned with OKEN Scanner

Există puține date referitoare la *tipurile de celule care prezintă anomalii*. Din datele lui Krogh Jensen și Killman (126, 127) reiese că în leucemiile acute, cariotipurile anormale nu sînt limitate la celulele din seria granulocitară, ci sînt prezente și în precursorii eritroizi.

Faptul că în lichidul meningial al unui bolnav cu leucemie acută au fost evidențiate aceleași modificări cromozomiale ca și în măduvă pledează pentru *originea unicentrică și monoclonală* a leziunilor din leucemia acută (142).

7.3.3. Cariotipul în unele forme particulare de leucemie acută

a) *Leucemiile congenitale* sînt foarte rare. Simptomele pot fi prezente la naștere (tipul conatal) sau devin evidente în decursul primei luni de la naștere (tipul neonatal). Din punct de vedere citologic, există trei varietăți: mieloidă, histiomonocitoidă și limfoidă.

Majoritatea publicațiilor se referă la leucemiile congenitale apărute la pacienți mongoloidieni. În aceste cazuri predomină hiperdiploidia, cu surplus de cromozomi în grupele C și G, mai rar D și E (22, 32, 133, 183, 190, 223). La subiecții nemongoloidieni a fost observată trisomia G (24, 231), deleția brațelor unui cromozom nr. 3 (247), pseudodiploidie de tipul 46, XX,+D,−16 (14) sau 46,XX,−C,+D (37) și translocații între cromozomii C și G (90) și între B și C (230).

b) *Leucemii acute la gemeni.* Sandberg și colab. (204) au examinat doi gemeni, probabil dizigoți, care sufereau de leucemie acută mieloblastică. Cariotipurile au fost deosebite, ceea ce, admițînd o etiologie comună, ar putea constitui o reflectare a genotipurilor lor diferite. Această supoziție este confirmată de faptul că la doi gemeni monozigoți cu leucemie acută, Hilton și colab. (89) au identificat o anomalie identică, trisomia unui cromozom din grupa C.

c) *Leucemii acute la bolnavi cu anomalii cromozomiale.* Apariția leucemiilor acute a fost semnalată la pacienții cu sindrom Down, sindrom Turner (181), sindrom Klinefelter (106, 140), mozaic X0/XXX (136), mozaic XY/X0 (29), trisomie D (sindromul Patau) (209), trisomie D parțială (246), sindrom Bloom și anemie Fanconi (144), translocație t(Gp−; Dp+) (70). Berger (19) evidențiază 5 anomalii cromozomiale constituționale într-un lot de 231 de pacienți cu hemopatii, iar Prigogina și colab. (182) observă o translocație constituțională la 100 de pacienți cercetați. Într-o investigație asemănătoare, Harnden și colab. (85) remarcă 8 aberații cromozomiale la un lot de 1149 de bolnavi.

Scanned with OKEN Scanner

Prezența acestor anomalii, a căror incidență este mai ridicată decît la populația martoră, sugerează că instabilitatea cariotipică reprezintă un factor favorizant pentru instalarea leucemiilor.

7.3.4. Relația dintre tipul citologic al leucemiei și modificările cromozomiale

Lucrările lui Sandberg și colab. (207, 208) și Lampert și colab. (129, 130) au demonstrat că în *leucemiile acute limfoblastice* se întîlnesc constant numere modale hiperdiploide (depășind uneori 90 de cromozomi) și valori hiperdiploide ale ADN nuclear, în timp ce în *leucemiile acute mieloblastice* se observă fie hipodiploidie, fie o hiperdiploidie moderată. *Leucemiile acute consecutive policitemiei vera* (7, 9, 49, 108, 160) și *leucemiile acute cu celule eozinofile* (63) nu prezintă particularități citogenetice remarcabile.

Investigînd cu o tehnică de bandare o *leucemie mielomonocitară*, Brandt și colab. (25) evidențiază prezența unei trisomii G21 în aproape 100% din celulele medulare. Aceste rezultate arată că cele două tipuri de celule leucemice, aparținînd seriei granulocitare și monocitare, derivă dintr-o celulă precursoare comună. Întrucît anomalii ale cromozomilor din grupa G fuseseră semnalate și în alte publicații (5, 34, 74, 99, 119, 149, 161, 200), efectuate cu tehnici clasice de colorație, s-a sugerat că leucemia acută mielomonocitară a adulților ar putea reprezenta o entitate deosebită de leucemia acută mielomonocitară a copiilor (20, 228) și de leucemia mielomonocitară cronică a adulților (98), care sînt caracterizate prin anomalii cariotipice diferite. Unele excepții au fost însă deja semnalate. Astfel, Rutten și colab. (199) au publicat cazul unui bolnav cu leucemie mielomonocitară acută care prezenta trisomia cromozomilor nr. 9.

7.3.5. Corelația dintre modificările cromozomiale și prognosticul bolnavilor cu leucemie acută

Remisiunile se instalează mai frecvent, iar *supraviețuirea* este considerabil mai lungă la bolnavii care prezintă numai celule diploide sau celule diploide și aneuploide decît la cei care în decursul bolii au avut numai metafaze anormale (80, 202, 203, 226). Este posibil ca acest fenomen să fie, cel puțin în parte, consecința

Scanned with OKEN Scanner

tratamentului: absența totală a elementelor celulare normale nu permite repopularea măduvei, în situația în care celulele leucemice au răspuns la tratament și au dispărut din măduvă. Se pare că la pacienții leucemici care nu au decît celule anormale în măduvă se obțin rezultate mai bune în ceea ce privește supraviețuirea utilizînd numai o terapie de susținere și o chimioterapie moderată decît prin eliminarea totală a celulelor leucemice din măduvă printr-o chimioterapie energică. Aceste cazuri ar putea beneficia de transplante medulare.

În leucemiile acute, spre deosebire de leucemia mieloidă cronică, anomaliile cromozomiale, odată instalate, manifestă o deosebită constanță. Deși existența fenomenelor de evoluție clonală a fost descrisă și în leucemiile acute (43, 61, 82, 189, 198), liniile celulare sînt în general stabile (34) și nu se modifică în decursul diferitelor faze clinice. În remisiunile induse terapeutic, celulele anormale sînt înlocuite cu celule diploide. În recăderi, reapar însă celule avînd caracteristicile citogenetice ale populației celulare anormale inițiale (80, 189).

BIBLIOGRAFIE

1. AHEARN M. J., TRUJILLO J. M., FREIREICH E. F. — *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, 1971, *12*, 58.
2. ALTMAN A. A., PALMER C. G., BAEHNER R. L. — *Blood*, 1974, *43*, 341.
3. ANDAY G. J., TISCHKOFF G. — *Cancer*, 1969, *24*, 826.
4. ATKIN N. B., TAYLOR M. C. — *Cytogenetics*, 1962, *1*, 97.
5. ATKINS L., GOULIAN M. — *Cytogenetics*, 1965, *4*, 321.
6. AWA A. A., MITANI M., OKOCHI K. — *Z. Krebsforsch.*, 1965, *67*, 23.
7. BAIKIE A. G. — Chromosomes and leukemia, Comunicare la Congresul European de hematologie, Strasbourg, 1965.
8. BAIKIE A. G., COURT BROWN G., BUCKTON K. E. și colab. — *Nature (Lond.)*, 1960, *188*, 1 165.
9. BAIKIE A. G., JACOBS P. A., MC BRIDE J. A., TOUGH I. M. — *Brit. med. J.*, 1961, *i*, 1 564.
10. BASERGA A., CASTOLDI L. G. — *Lancet*, *ii*, 1 299.
11. BASERGA A., CASTOLDI L. G., FRANCESCHINI F. — *Schweiz. med. Wschr.*, 1966, *96*, 1 220.
12. BAUKE J. — *Cancer*, 1969, *24*, 643.
13. BAUKE J. — *Dtsch. med. Wschr.*, 1973, *98*, 1 956.
14. BAUKE J., CREMER J. H., HEIMPEL H. — *Z. Kinderheilk.*, 1970, *108*, 288.
15. BAUKE J., NEUBAUER A., SCHOFFLING K. — *Dtsch. med. Wschr.*, 1967, *92*, 301.
16. BAUTERS F., CROQUETTE M. F., DELMAS-MARSALET Y. și colab. — *Nouv. Rev. franç. Hématol.*, 1970, *10*, 697.
17. BERGER R. — *Ann. Génét.*, 1965, *8*, 70.

Scanned with OKEN Scanner

8. DISPROTEINEMIILE

8.1. Introducere

Disproteinemiile sînt afecțiuni caracterizate prin proliferarea celulelor care produc imunoglobuline IgG, IgA și IgM. În grupa disproteinemiilor sînt incluse macroglobulinemia Waldenström și mielomul multiplu, cărora li se adaugă disproteinemiile simptomatice.

8.2. Macroglobulinemia Waldenström

În anul 1961, Bottura și colab. (5) au semnalat existența unei clone cu 47 de cromozomi în celulele medulare ale unui pacient cu macrogobulinemie Waldenström; supranumerarul era un cromozom mare, de talia cromozomilor nr. 2, dar cu centromerul mai distal decît al acestora (fig. 40). Ulterior, existența unor cromozomi markeri de acest tip, pentru care Benirschke (2) a propus denumirea de *„markeri W"*, a fost confirmată de numeroși autori (6, 7, 13, 14, 17, 27, 30, 34). Există însă și cazuri de boală Waldenström în care nu s-au evidențiat cromozomi markeri (16). Frecvența acestor cazuri variază, în funcție de statistici, între 21% (35) și 39% (19).

Mărimea cromozomului marker este de obicei similară cu a cromozomilor din grupa A. Centromerul ocupă o poziție variabilă: mediană (2, 17), submediană (5), subtelocentrică (6) sau acrocentrică (15). Broustet și colab. (7) au observat și cromozomi markeri de tip dicentric.

Incidența cu care apare cromozomul marker în celulele medulare este variabilă de la caz la caz, limitele citate fiind 1,5% și 51% (19, 35). În majoritatea cazurilor, incidența este de 10–30%. Se pare că examinările directe ale măduvei dau un procent mai mare de mitoze pozitive decît culturile de sînge periferic. Broustet și colab. (7) presupun că în boala Waldenström ar coexista două populații celulare, una normală și una anormală, prima adaptîndu-se mai bine condițiilor *in vitro*.

Există puține date referitoare la tipul de celule în care se întîlnește cromozomul marker. Anomalii similare cu cele observate în ele-

Scanned with OKEN Scanner

mentele medulare au fost întîlnite în limfocitele sîngelui periferic stimulat cu PHA, precum și în celulele provenite din ganglionii limfatici (29).

Originea cromozomului marker este încă neclară. Faptul că o femeie cu boală Waldenström prezenta anomalia, în timp ce sora sa

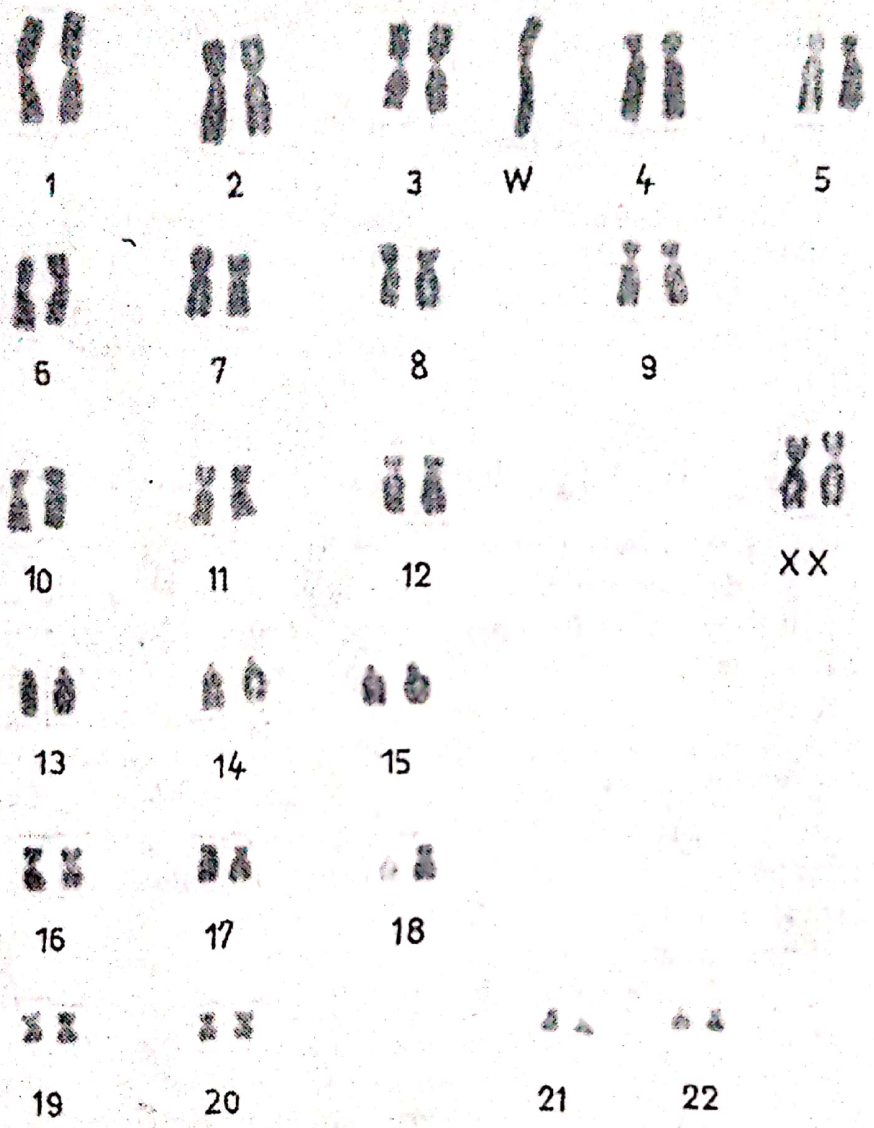


Fig. 40 — Cariotipul unei celule cu 47 de cromozomi într-un caz de boală Waldenström. Cromozomul supranumerar (W) este asemănător cromozomilor din perechea nr. 2.

monozigotă, care era sănătoasă nu o prezenta, demonstrează că extracromozomul din grupa A este rezultatul unei mutații cromozomiale cîștigate (38). În același sens pledează prezența cromozomului marker în celulele sanguine și absența sa în fibroblaste (14). Mecanismul intim de formare este reprezentat, după Patau (28), de un proces de endo-

Scanned with OKEN Scanner

reduplicare selectivă a unui cromozom din grupa A, probabil A2; diferențele de mărime și poziție centromerică dintre cromozomul marker și cromozomii grupei A s-ar explica prin procese ulterioare de inversie pericentrică și formare de izocromozomi. Observațiile autoradiografice ale lui Heni și Siebner (20) au arătat că cromozomul marker prezintă o marcare similară cu a cromozomilor din grupa A. Broustet și colab. (7), care au remarcat frecvența cu care cromozomii din grupa A prezintă constricții secundare pericentrice sau telomerice, admit că o constricție secundară pericentrică ar putea duce la formarea unui izocromozom, în timp ce o constricție telomerică ar putea determina o inversie pericentrică.

Specificitatea cromozomului marker este discutabilă. Anomalia nu apare în toate cazurile de boală Waldenström, iar incidența celulelor pozitive este uneori extrem de joasă. Pe de altă parte, cromozomi similari au fost descriși și în mieloame, leucoze, limfosarcoame (19).

În afară de cromozomul W, în boala Waldenström pot apărea și alte anomalii (trisomia cromozomilor C, F, G, fragmente acentrice etc.) (19).

8.3. **Mielomul multiplu**

Primele observații efectuate asupra mieloamelor de către Richmond și colab. (32) și Pfeiffer și colab. (30) nu au relevat existența unor anomalii cromozomiale. Castoldi și colab. (9) publică în 1963 un studiu asupra unei paciente la care se evidențiase un număr modal de 44 de cromozomi și existența unui cromozom marker metacentric de mărime mijlocie. Aproape simultan, Bottura (4) studiază un bolnav care, alături de o linie normală, prezenta o linie cu 45 de cromozomi, datorită lipsei unui acrocentric mic.

Spre deosebire de autorii precedenți, Lewis și colab. (24) evidențiază prezența hiperdiploidiei (50–85 de cromozomi) la 3 din cei 4 bolnavi examinați. În unele cazuri, anomaliile numerice și structurale ale cromozomilor sînt variabile și nu se constituie linii celulare anormale omogene (12, 18).

Într-un caz de mielom multiplu fără paraproteine, Coltman (10) remarcă existența unui cromozom marker metacentric, mai mare decît cromozomii grupei A. Prezența unor cromozomi markeri de talia cromozomilor A sau B, pe care Houston și colab. (21) îi denumesc markeri MG, deoarece apar în gamopatiile monoclonale, a fost remarcată în mieloame γG, γA și γM (25, 34, 37). Tassoni și colab. (39) insistă asupra frecvenței cu care apar cromozomi markeri acrocentrici de talia cromozomilor C. Uneori, cromozomii markeri de tip MG coexistă

Scanned with OKEN Scanner

cromozomi markeri de tip acrocentric (26). În singurul caz de plasmocitom γD examinat au fost observați cromozomi adiționali în grupele A, C și G, precum și anomalii structurale (36).

Numărul bolnavilor care prezintă clone anormale în aspiratul medular este însă relativ redus: 7 din 38 de cazuri examinate de Anday și colab. (1), 7 din 25 de pacienți studiați de Krogh Jensen și colab. (22). În unele cazuri, incidența plasmocitelor în mitoză este redusă, iar evidențierea celulelor cu anomalii ar necesita studierea unui număr mare de metafaze. Acest deziderat este greu de îndeplinit, deoarece calitatea preparatelor cromozomiale din aspiratele medulare ale pacienților cu mielomatoză este adesea nesatisfăcătoare (11, 22). În alte cazuri, însă, celulele mielomatoase au probabil o constituție diploidă, fenomen care a fost semnalat și în unele leucemii acute.

Numărul lucrărilor efectuate cu tehnici de bandare este încă foarte redus. Articolul lui Wurster-Hill și colab. (40) descrie prezența unui segment suplimentar pe unul din cromozomii nr. 14 într-un caz de mielom multiplu și unul de leucemie plasmocitară. La un pacient cu mielom multiplu, Philip și Drivsholm (31) observă 3 cromozomi markeri rezultați din translocații între cromozomii nr. 1 și 16, 1 și 15, 3 și 5. Cromozomii perechii 14 erau însă normali.

8.4. **Paraproteinemiile simptomatice**

În 4 cazuri de paraproteinemii simptomatice, Fergusson și Mackay (14) nu observă modificări cromozomiale. Siebner (34) găsește un complement cromozomial normal într-un caz de limfosarcom cu gamopatie γM și trisomia grupei D cu lipsa unui cromozom A într-o reticuloză cu disproteinemie. Blake (3) constată prezența unui cromozom de talie mare, cu centromerul median sau submedian, la un bolnav cu limfosarcom care prezenta două macroglobuline și o cantitate mare de crioglobuline. Levin și colab. (23) observă prezența unui cromozom suplimentar mare, de tipul cromozomilor A, în două cazuri de paraproteinemie, una însoțind o leucemie mieloidă cronică, cealaltă — o hemoglobinurie la frig. Existența unui cromozom marker de acest tip a mai fost notată și de Broustet și colab. (6), într-un caz de crioglobulinemie și de Ritzmann și colab. (33) într-o leucemie mieloidă cronică cu gamopatie monoclonală.

Datele existente fac improbabilă ipoteza ca markerii observați în paraproteinemii să fie constituiți din componente cromozomiale identice. Este însă posibil ca tehnicile de bandare să releve existența unor regiuni sau puncte afectate preferențial în procesele de rupere care stau la baza rearanjamentelor.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. ANDAY G. J., GEORGE J., FISHKIN B., GABOR E. P. — *J. Nat. Cancer. Inst.*, 1974, *52*, 1 069.
2. BENIRSCHKE K., BROWNHILL L., EBAUGH F. G. — *Lancet*, 1962, *i*, 594.
3. BLAKE M. N. — *Austr. Ann. Med.*, 1966, *15*, 162.
4. BOTTURA C. — *Acta haemat.*, 1963, *30*, 274.
5. BOTTURA C., FERRARI I., VEIGA A. A. — *Lancet*, 1961, *i*, 1 170.
6. BROUSTET A., HARTMANN L., MOULINER J. și colab. — *Nouv. Rev. franc. Hemat.* 1967, *7*, 809.
7. BROUSTET A., VEYRET V., MORETTI G. — *Ann. Biol. clin.*, 1968, *26*, 17.
8. CARDINI G., BERSI M., GASPARINI C. — *Nouv, Rev. franç. Hemat.* 1970. *10*, 787.
9. CASTOLDI G. L., RICCI N., PUNTURIERI R., BOSI L. — *Lancet*, 1963, *i*, 829.
10. COLTMAN C. A. JR. — *Arch. int. Med.*, 1967, *120*, 687.
11. DARTNALL J. A., MUNDY G. R., BAIKIE A. G. — *Blood*, 1973, *42*, 229.
12. DAS K. C., AIKAT B. K. — *Blood*, 1967, *30*, 738.
13. ELVES M. W., ISRAELS M. C. G. — *Brit. med. J.*, 1963, *ii*, 1 024.
14. FERGUSSON J., MACKAY I. R. — *Austr. Ann. Med.*, 1963, *12*, 197.
15. FORTEZA BOVER G., GARCIA-CONDE G. — *Sangre*, 1966, *11*, 305.
16. GANNER E. — *Wien. klin. Wschr.*, 1967, *79*, 20.
17. GERMAN J. L., BIRO C. E., BEARN A. G. — *Lancet*, 1962, *ii*, *48*.
18. GUILLAN R. A., RANJINI R., ZELMAN S. și colab. — *Cancer*, 1970, *25*, 1 187.
19. HELLRIEGEL K. P. — *Internist*, 1971, *12*, 13.
20. HENI F., SIEBNER H. — *Dtsch. med. Wschr.*, 1963, *88*, 1 781.
21. HOUSTON E. W., RITZMANN S. E., LEVIN W. C. — *Blood*, 1967, *29*, 214.
22. KROGH JENSEN M., ERIKSEN J., NILTON DJERNES G. — *Scand. J. Haemat.*, 1975, *14*. 201.
23. LEVIN W. C., HOUSTON W. E., RITZMANN S. E. — *Clin. Res.*, 1964, *12*, 217.
24. LEWIS F. J. W., MCTAGGART M., CROW R. S., WILLS M. R. — *Lancet*, 1963, *i*, 1 183.
25. MALACARNE P., DALLAPICCOLA B. — *Rif. Med.*, 1967, *23*, 3.
26. MANCINELLI S., DURANT J., HAMMACK W. J. — *Blood*, 1969, *33*, 225.
27. MORETTI G., HARTMANN L., STAEFFEN F. și colab. — *Ann. Génét.*, 1965, *8*, 55.
28. PATAU K. — *Lancet*, 1961, *ii*, 600.
29. PETIL R., VRYENS R., CAUCHIE C., KANSLICHER G. L. — *Acta clin. belg.*, 1968, *23*, 182.
30. PFEIFFER R. A., KOSENOW W., BAUMER A. — *Klin. Wschr.*, 1962, *40*, 342.
31. PHILIP P., DRIVSHOLM A. — *Biomed.*, 1974, *21*, 429.
32. RICHMOND H. G., ONUKI Y., POMERAT C. M. — *Brit. J. Cancer*, 1961, *15*, 692.
33. RITZMANN S. E., STOUFFLET E. J., HOUSTON E. W., LEVIN W. C. — *Amer. J. Med.*, 1966, *41*, 981.
34. SIEBNER H. — *Arzneimittel. Forsch.*, 1967, *21*, 359.
35. SIEBNER H. — *Fortschr. Med.*, 1969, *87*, 30.

Scanned with OKEN Scanner

9. LIMFOAMELE MALIGNE

9.1. Introducere

Deşi primele studii referitoare la constituţia cromozomială a limfoamelor maligne au apărut cu 13 ani în urmă, numărul cazurilor examinate este încă redus, din cauza unor dificultăţi tehnice considerabile. Încadrarea histopatologică a cazurilor este de asemenea dificilă. Publicaţiile recente asupra limfoamelor maligne utilizează clasificarea lui Rappaport (40). Majoritatea lucrărilor mai vechi se bazează însă pe alte clasificări şi întrucît detaliile histopatologice sînt adesea insuficiente pentru a permite reclasificarea cazurilor, vom încadra datele existente în următoarele categorii (13): limfoame gigantofoliculare (boala Brill-Symmers); limfosarcoame; reticulosarcoame; boala Hodgkin; limfoame de origine extraganglionară (micoza fungoidă, sindromul Sézary); limfomul african (tumoarea Burkitt).

9.2. Limfomul giganto-folicular

Spiers şi Baikie (46, 48) au studiat 6 cazuri. În primul caz au fost evidenţiate două linii celulare, una cu 47 de cromozomi (supranumerarul fiind un acrocentric mic) şi una cu 48 de cromozomi şi doi supranumerari (un acrocentric mic şi un cromozom din grupa C). Majoritatea celulelor din cel de al doilea caz aveau 47 de cromozomi; supranumerarul era un acrocentric care a fost interpretat ca un cromozom nr. 17–18 cu braţele scurte deletate. Aproape toate mitozele cazului 3 erau tetraploide, fără să se evidenţieze cromozomi anormali. În cazul 4 au fost observate două linii celulare: una minoră cu 46 de cromozomi şi una majoră cu 48 de cromozomi, supranumerarii aparţinînd grupei C. Cazul 5 a fost caracterizat printr-o distribuţie largă a numărului de cromozomi (41–93). În cazul al 6-lea s-a putut număra o singură mitoză cu 91 de cromozomi; cariotipul nu era însă cel a unei celule tetraploide adevărate.

Într-un caz de limfom giganto-folicular, Miles (29) a observat o mitoză cu 48 de cromozomi.

Scanned with OKEN Scanner

9.3. **Limfosarcoame**

Tjio și colab. (54) au observat existența unor celule pseudodiploide în măduva osoasă și ganglionii unui pacient cu limfosarcom: lipsea cîte un cromozom din grupele C și D, care erau înlocuiți cu doi markeri (un acrocentric lung și un metacentric de talia cromozomilor A3).

Spiers și Baikie (48) au studiat 5 cazuri. În primul caz, majoritatea celulelor au fost diploide; 15% din celule au prezentat un fragment centric adițional. În cazul 2 s-a evidențiat un submetacentric lung și un metacentric de talia cromozomilor din grupa C, alături de prezența unor modificări numerice. În cazul 3, o mare parte a celulelor au fost hipodiploide, cu pierderi mai ales în grupele F și G. Cazul 4 a prezentat variații numerice între hipodiploidie și hiperdiploidie, iar în cazul al 5-lea, metafazele au fost diploide sau hipodiploide, fără anomalii semnificative.

Berger și Parmentier (5) au examinat două cazuri. În primul caz, remanierile cromozomiale interesau un cromozom din grupa D (Dq+ și Dq—). În al doilea caz s-a evidențiat o clonă anormală cu 47 de cromozomi; supranumerarul a fost interpretat ca un E16, dar s-a menționat și posibilitatea ca el să fie un cromozom C anormal.

Adam și colab. (1) au constatat un număr modal de 48, supranumerarii fiind încadrați în grupa C; unul din cromozomii grupei G era deletat, fiind asemănător cu un cromozom Ph^1.

Examinînd o linie celulară derivată *in vitro* dintr-un limfosarcom, Suarez și colab. (53) observă o poliploidie înaltă. Doi markeri reținn atenția: un acrocentric lung și un cromozom nr. 10 cu constricții secundare terminale pe brațele lungi.

Un număr mai mare de cazuri — 11 — au fost publicate de Coutinho și colab. (8). Două cazuri au fost alcătuite din celule normale sau hipodiploide, ultimele reprezentînd probabil artefacte tehnice. În celelalte cazuri au fost evidențiate clone maligne (peridiploide sau pseudodiploide), pe lîngă un număr variabil de celule cu cariotip normal. Deși fiecare tumoare prezenta o linie celulară specifică, au fost observate cîteva anomalii comune mai multor cazuri: monosomia cromozomului nr. 1 (3 cazuri), trisomia cromozomului nr. 3 (4 cazuri), cromozomi suplimentari în grupa E (6 cazuri). Morfologia cromozomilor markeri a fost variabilă, dar cromozomii acrocentrici lungi au fost observați ceva mai frecvent decît cromozomii submetacentrici și subtelocentrici lungi (fig. 41).

Numărul cercetărilor care au utilizat tehnici de bandare a cromozomilor este încă redus. Fleischmann și colab. (15) au publicat

Scanned with OKEN Scanner

un caz care prezenta următoarele particularități referitoare la proporția cromozomilor normali: creșterea numerică a cromozomilor nr. 3 și nr. 7; scăderea numerică a cromozomilor nr. 4, 6, 9, 17, 18, 19 și deleția unui cromozom nr. 1. Originea unor cromozomi markeri nu a putut fi stabilită.

Fig. 41 — Cariotipul unei celule cu 48 de cromozomi într-un caz de limfosarcom. Se remarcă prezența unui cromozom marker acrocentric lung (M).

Reeves (41) a analizat 4 cazuri. Anomaliile comune tuturor celulelor examinate în primul caz au constat în pierderea unui cromozom nr. 1, translocația de material pe brațul lung al unui cromozom nr. 3, deleția brațului lung al unui cromozom nr. 9 și trisomia cromozomilor nr. 14 și 17. În cazul 2 a fost observată prezența unui cromozom suplimentar nr. 1, ale cărui brațe scurte și lungi erau deletate; unul din cromozomii nr. 14 prezenta o bandă suplimentară pe brațul lung (14q+). În cazul 3 predomina o populație celulară hipotetraploidă. În plus față de modificările numerice, au fost observate anomalii structurale, a căror origine a fost parțial stabilită. În cazul 4

Scanned with OKEN Scanner

au fost prezente două sublinii înrudite. Linia minoră a fost caracterizată prin deleția terminală a unui cromozom nr. 1 și prezența a 4 markeri. În celulele celei de a doua sublinii s-au observat deleția terminală a unui cromozom nr. 9 și prezența a doi cromozomi markeri.

9.4. **Reticulosarcoame**

Sasaki și colab. (44) au studiat două cazuri. Primul caz prezenta o constituție pseudodiploidă, un cromozom din perechea A2 și unul din grupa C fiind înlocuiți prin doi markeri submetacentrici lungi. Al doilea caz a fost caracterizat prin prezența unui număr remarcabil de markeri: un submetacentric de mărimea cromozomilor C8–10, doi acrocentrici lungi, un metacentric de dimensiuni mai mari decît cromozomii grupei F și un metacentric ceva mai mic decît cromozomii grupei C. O particularitate interesantă o constituie faptul că anomaliile descrise au fost întîlnite, în primul caz, atît în celulele din exsudatul ascitic, cît și în culturile de sînge, iar în al doilea caz au fost prezente în măduva osoasă și în culturile de sînge periferic. Tjio și colab. (54), care au observat modificări cromozomiale identice în măduva osoasă și în ganglionii limfatici ai unui pacient, presupun că procesul neoplazic ar interesa simultan celulele din seria limfocitară și mieloidă. După Sandberg și colab. (43), celulele cu anomalii cromozomiale provenite din măduva osoasă a pacienților ar reprezenta celule metastatice originare din țesutul tumoral ganglionar. O interpretare similară i se datorește lui Obara și colab. (36), care au evidențiat prezența a 4 linii celulare în 3 țesuturi hematopoietice diferite ale unui pacient cu reticulosarcom (o linie în ganglioni, una în sîngele periferic și două în măduva osoasă). Originea monoclonală a celor patru linii a fost recunoscută pe baza unor anomalii cromozomiale comune (trisomia cromozomilor E 16, E 17 și E 18, pierderea unui cromozom A 1, a doi cromozomi F și a 2–4 cromozomi C). Cei patru cromozomi markeri (doi submetacentrici lungi de tipuri diferite, un acrocentric lung și doi cromozomi inelari) au apărut însă în combinații caracteristice pentru fiecare linie. Autorii au sugerat că linia originală a apărut în ganglionul limfatic. Descendentele acestor celule au dat naștere unei linii care s-a adaptat mediului sanguin. Apariția unor mutații consecutive ar fi permis constituirea liniilor medulare.

Spiers și Baikie (46, 48) prezintă rezultatele unui studiu referitor la 5 cazuri. În primul caz, aproape toate metafazele erau hipotetraploide, cu un număr modal de 88. Se observă pierderi cromozomiale

Scanned with OKEN Scanner

semnificative în grupa 17–18 și în grupele D și G. În cazul 2, aproape toate mitozele erau peritetraploide. În cazul 3, toate mitozele au fost hipodiploide, fără interesarea constantă a anumitor cromozomi. În cazul 4 au fost numărate trei celule, avînd 46, 51 și 58 cromoozmi; s-au observat mai multe mitoze poliploide cu microcromozomi. Cazul 5 a prezentat un număr modal de 44; au fost observate, constant, constricții secundare accentuate ale cromozomilor 1, 9, și 17.

Alte 5 cazuri au fost examinate de Miles (29). Într-un caz au fost observate numai celule diploide; prezența unor celule diploide a mai fost notată în alte trei cazuri, alături de celule anormale. În două cazuri, cîte un cromozom din perechea nr. 1 era înlocuit cu un marker submetacentric lung. Unul din cazuri prezenta constricții secundare accentuate ale cromozomilor nr. 9; această anomalie fusese remarcată într-o publicație anterioară a aceluiași autor (31).

Într-un caz de reticulosarcom, Kajii și colab. (21) constată înlocuirea unui cromozom nr. 3 cu un marker lung submetacentric, celulele avînd astfel un aspect pseudodiploid; mai puțin constantă a fost deleția brațelor scurte ale unui cromozom nr. 17–18, o creștere a dimensiunii brațului lung al unui cromozom B și pierderea cromozomului Y. În splina unui pacient cu reticuloendoterioză leucemică, Yam și Castoldi (61) observă un cromozom anormal în grupa A, cromozomi suplimentari în grupa C și monosomie G.

Ponti și colab. (38) și Wisniewski și Korsak (59) nu observă prezența unor anomalii în măduva osoasă și în culturile de sînge periferic ale unor pacienți cu reticulosarcom. Bauke și Schöffling (4) constată un număr modal de 104–106 și prezența a doi cromozomi markeri în celulele medulare ale unui pacient cu reticuloză malignă.

În toate cazurile studiate de Coutinho și colab. (8) a fost observată prezența unor linii constituite din celule cu cariotip normal, alături de clone cu modificări cromozomiale. În cazul 1 au fost evidențiate două clone anormale: una pseudodiploidă (în care doi cromozomi din grupa G erau înlocuiți cu doi markeri) și una hiperdiploidă, cu 51 de cromozomi. Celulele cazului 2 au avut ca element comun prezența unui cromozom suplimentar în grupa C, celelalte variații fiind inconstante. În cazul 3, clona dominantă prezenta un cromozom Y suplimentar.

Wisniewski și colab. (60) au aplicat o tehnică de bandare Giemsa în 4 cazuri. În primul caz a fost evidențiată o clonă hiperdiploidă cu 47 de cromozomi, datorită prezenței unui cromozom suplimentar C8. Clona anormală evidențiată în cazul 2 prezenta 47–50 de cromozomi, cu cromozomi suplimentari în grupele C, E și G și doi cromozomi markeri (un submetacentric mare și un cromozom inelar). În cazul 3 au fost observate numai celule normale. În sfîrșit, în cazul 4

Scanned with OKEN Scanner

a fost observată o clonă pseudodiploidă cu doi cromozomi markeri metacentrici.

Trei alte cazuri au fost examinate în detaliu de Reeves (41). Primul caz prezenta un număr modal peridiploid. Celulele au conținut un cromozom anormal 2p+; unul din cromozomii nr. 15 lipsea. În cazul 2, majoritatea celulelor au prezentat 45 de cromozomi. Doi cromozomi markeri (6q— și 15q+) au apărut în mai multe celule. În cazul al 3-lea, numărul modal a fost de 48. Fiecare celulă conținea cel puțin 4 cromozomi anormali (3p—, 9q—, 11q+ și 12q+).

9.5. **Boala Hodgkin**

Spriggs și Boddington (50) au observat hipotetraploidie (număr modal: 83 de cromozomi) și un marker lung telocentric în celulele obținute dintr-un ganglion limfatic. Baker și Atkin (3) au studiat două cazuri: primul prezenta o linie diploidă și una triploidă (70–75 de cromoozmi); în al doilea caz s-a evidențiat o linie diploidă și una hiperdiploidă cu 48–49 de cromozomi. Ricci și colab. (42) au individualizat două linii celulare deosebite și au observat un izocromozom pentru brațele lungi ale unui cromozom 17–18.

Spiers și Baikie (48) au examinat 6 cazuri. În două dintre ele nu s-au observat anomalii cromozomiale. În toate celelalte cazuri exista o proporție variabilă (57–76%) de celule normale. În două cazuri s-a observat deleția brațelor scurte ale cromozomilor 17–18. Procentul de celule aneuploide a fost variabil, dar în general nu prea ridicat; două cazuri au prezentat 12 și respectiv 8% celule hiperdiploide; în al treilea caz, 11% din mitoze au fost hipertriploide, iar în al patrulea caz, 6% din mitoze prezentau 51–100 de cromozomi.

Miles și colab. (31) au studiat 5 cazuri. Într-un caz s-au obținut numai celule normale, iar în alt caz numai celule heteroploide. În celelalte trei cazuri au coexistat două linii celulare, una diploidă și una peritriploidă sau hipotetraploidă. În patru din aceste cazuri s-au observat constricții secundare accentuate ale cromozomilor C9. Frecvența crescută a constricțiilor secundare pe cromozomul nr. 9, precum și exagerarea acestor constricții a fost notată și de Lawler (24) în culturile de sînge periferic de la bolnavii cu boala Hodgkin.

Seif și Spriggs (45) au studiat 7 cazuri. Un caz a prezentat numai celule diploide, iar în altul s-a numărat o singură celulă care avea 48 de cromozomi. În celelalte cazuri s-au individualizat două linii celulare, una normală, iar cealaltă triploidă – hipotetraploidă. Două cazuri au prezentat cromozomi markeri, iar într-un caz s-a notat deleția probabilă a brațelor scurte ale unui cromozom nr. 18.

Scanned with OKEN Scanner

Coutinho şi colab. (8) au examinat 14 cazuri. În 5 cazuri au fost observate numai celule normale. Ceilalţi pacienţi au prezentat, alături de celulele normale, clone anormale ale căror celule aveau numere de cromozomi situate în regiunea hipotriploidă – hipotetraploidă şi prezentau diferiţi cromozomi markeri (submetacentrici, subtelocentrici şi acrocentrici lungi, dicentrici şi cromozomi inelari, cromozomi „minute").

În unul din cazurile pe care le-am examinat (37) am constatat prezenţa a trei linii celulare: o linie hipotriploidă care prezenta doi cromozomi markeri (un submetacentric şi un acrocentric lung), o linie diploidă şi o linie pseudodiploidă (46, XX, –C, +D). Prima clasă este reprezentată probabil de celulele Hodgkin, iar a doua de celulele limfoide normale. Am sugerat că metafazele pseudodiploide (care prezintă o constituţie cromozomială sugerînd o origine clonală) ar putea deriva dintr-o populaţie de limfocite neoplazice. Este posibil ca şi celule aparent diploide să fie neoplazice (48). În acest caz, celulele pseudodiploide sau hiperdiploide ar putea reprezenta rezultatul unei evoluţii clonale, similare procesului observat frecvent în leucemia granulocitară cronică. Unul din cazurile examinate recent de Wisniewski şi colab. (60), care prezenta 4 linii celulare (diploidă, pseudodiploidă, hiperdiploidă şi hipotetraploidă), pare să confirme această ipoteză.

În studiul lui Reeves (41) au fost incluşi 3 pacienţi. În primul caz, majoritatea celulelor aveau 81 de cromozomi. Anomaliile structurale comune mai multor celule au constat în prezenţa unui cromozom 14q+ şi a doi metacentrici mici, reprezentînd izocromozomi pentru braţele lungi şi respectiv scurte ale unui cromozom nr. 18; unul din cromozomii perechii nr. 6 prezenta o deleţie a braţului lung (6q—). În cazul 2 a fost observat un cromozom anormal, interpretat ca rezultatul unei translocaţii între cromozomii 3 şi 11. În cazul 3, majoritatea mitozelor aparţineau unei populaţii celulare anormale cu 61–80 de cromozomi.

Deşi datele referitoare la limfoamele maligne sînt fragmentare, iar multe din rezultatele obţinute cu ajutorul tehnicilor clasice de colorare vor trebui reconsiderate, se pot face totuşi cîteva *generalizări*:

a) Există o diferenţă netă între distribuţia numerelor de cromozomi în boala Hodgkin şi în celelalte limfoame maligne. Majoritatea cazurilor de boala Hodgkin prezintă numere modale peritriploide (57–90 de cromozomi) (fig. 42), în timp ce limfosarcoamele şi majoritatea reticulosarcoamelor au de obicei numere modale hipodiploide-hiperdiploide (44–56 de cromozomi). Numai o treime din ca-

Scanned with OKEN Scanner

zurile de reticulosarcoame incluse în statistica lui Reeves (41) au prezentat numere modale poliploide.

b) În limfo- și reticulosarcoame, dar mai ales în boala Hodgkin, a fost observată prezența unui număr semnificativ de metafaze diploide. Majoritatea lor ar putea aparține celulelor limfoide sau

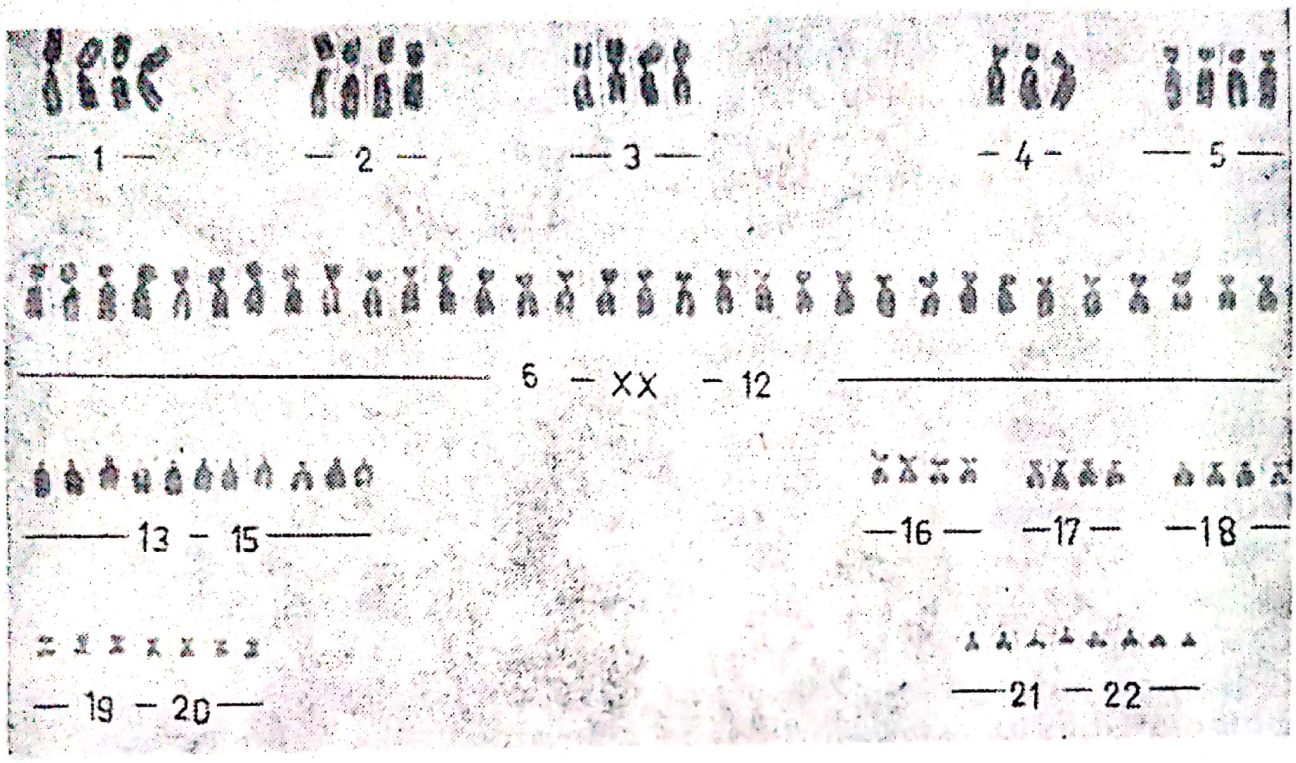


Fig. 42 — Cariotipul unei celule cu 89 de cromozomi într-un caz de boală Hodgkin.

plasmatice, reprezentînd o reacție imună. Este însă posibil ca o parte din ele să reprezinte limfocite neoplazice (30, 37). Din această populație de limfocite neoplazice ar rezulta, printr-un proces de evoluție clonală, celulele pseudo- și peridiploide, precum și celulele periteraploide. În cazul bolii Hodgkin, evoluția s-ar face după următoarea schemă (30):

2n	——→	2n, peri-2n ——→
stadiu histologic precoce, încă neidentificat		predominanță limfocitară paragranulom
peri-2n și peri-4 n sau hipo-4n	——→	hipo-4 n
scleroză nodulară, granulom Hodgkin		celularitate mixtă, depleție limfocitară, sarcom Hodgkin

c) Există dovezi care sugerează originea unifocală și monoclonală a tuturor leziunilor ganglionare, precum și a celor din teritoriul extraganglionar (11).

Scanned with OKEN Scanner

d) Cromozomii E17–18 sînt adesea implicați în rearanjamente structurale sau sînt pierduți din celule (33, 34). Statistica lui Reeves (41) menționează 14 cazuri în care unul din cromozomii nr. 17 sau 18 prezenta o deleție a brațelor scurte sau lungi. Fleischmann și colab. (15), care au analizat distribuția cromozomilor în grupe, constată că din 36 de tumori asupra cărora se publicaseră suficiente detalii, cromozomii 17—18 au făcut obiectul unor pierderi în 12 cazuri, un singur caz prezentînd cromozomi suplimentari în această grupă.

e) Un număr mare de cazuri au prezentat constricții accentuate ale cromozomilor C9 (24, 29, 31). Uneori, ele se asociază cu modificări sugestive pentru o origine virală (47).

9.6. **Limfoame de origine extraganglionară (micoza fungoidă, sindromul Sézary)**

M i c o z a f u n g o i d ă este o varietate de limfom malign care afectează cu precădere pielea. Individualitatea sa este discutabilă și mulți autori o consideră drept o manifestare secundară în cadrul unui limfosarcom sau al bolii Hodgkin. Publicațiile referitoare la micoza fungoidă (12, 35) semnalează prezența unor modificări cromozomiale similare în mai multe țesuturi ale acelorași pacienți. Pe baza acestor observații, Erkman-Balis și Rappaport (12) au sugerat că micoza fungoidă ar constitui o proliferare neoplazică cutanată, care s-ar extinde în țesuturile extracutanate pe cale limfatică și hematogenă.

Existența s i n d r o m u l u i S é z a r y este controversată, unii autori considerînd că el reprezintă o variantă eritrodermică, cu celule neoplazice circulante, a micozei fungoide. Majoritatea pacienților cu sindrom Sézary prezintă numere peritetraploide de cromozomi (9, 26), dar a fost descrisă și o variantă cu celule mici (26). Celulele anormale răspund la stimularea cu PHA în culturi și s-a sugerat că ele ar reprezenta limfocite T (7).

9.7. **Limfomul Burkitt**

Tumoarea Burkitt este un limfom al copiilor, care survine cu o frecvență înaltă în anumite zone ale Africii și ale Noii Guinee. Atenția acordată acestei afecțiuni a fost stimulată de faptul că Epstein și colab. (10) au evidențiat prezența virusului Epstein-Barr (EB) într-o linie celulară derivată *in vitro* dintr-un caz de limfom Bur-

Scanned with OKEN Scanner

kitt. *Asocierea dintre limfomul Burkitt și virusul EB* este demonstrată de două categorii de argumente (22):

a) Dovezi serologice. Pacienții cu limfom african au prezentat reacții serologice anti-virus EB la titruri înalte.

b) Experiențe de hibridare a acizilor nucleici. Atît hibridarea ADN-ADN, cît și hibridarea ADN-ARN a relevat prezența ADN-ului viral EB în tumorile pacienților.

Majoritatea cercetărilor referitoare la constituția citogenetică a tumorilor Burkitt au fost efectuate pe linii celulare menținute perioade variabile de timp *in vitro*. Recent, Ikeuchi și colab. (19) au stabilit *in vitro* o nouă linie celulară de limfom Burkitt, desemnată B46M, și au derivat din ea 10 sublinii clonate. Examenul citogenetic al acestor sublinii a relevat cariotipuri diferite de cele ale liniei parentale, deși linia parentală prezenta o omogenitate cariologică remarcabilă. Este posibil ca unele celule variante să fi existat, cu o frecvență joasă, și în populația parentală unde însă nu au putut fi detectate, dar au proliferat selectiv în populațiile clonate. Nu poate fi exclusă însă nici eventualitatea ca ele să fi luat naștere *in vitro*, fie din cauza dezechilibrului inerent cauzat de condițiile de cultură, fie datorită prezenței continue a virusului EB. Rabson și colab. (39), care au izolat o linie aderentă la suprafața sticlei dintr-o cultură în suspensie de limfom Burkitt, constată o creștere importantă a ploidiei. Aceste date ridică posibilitatea ca unele rezultate să nu reflecte constituția reală, existentă *in vivo*, a tumorilor. Există însă și studii efectuate pe piese biopsice (16, 20, 28, 52), iar compararea lor cu rezultatele cercetărilor *in vitro* permite următoarea *sistematizare a anomaliilor cromozomiale* întîlnite mai frecvent în limfomul Burkitt:

a) Prezența unui cromozom suplimentar în grupa C a fost observată în liniile EB2, SL, JIYOYE (23, 32, 56), precum și în linii de limfom Burkitt din Noua Guinee (55). Se presupune că supranumerarul ar fi un cromozom nr. 12.

b) O constricție secundară subterminală localizată pe brațele lungi ale unui cromozom din grupa C, probabil C10, a fost observată în liniile EB1, EB2, EB3, JIYOYE (17, 23, 32, 57) și în cazurile de limfom Burkitt din Noua Guinee (53). Kohn și colab. (23) au sugerat că aceste constricții secundare ar reprezenta de fapt markeri caracteristici liniilor celulare de limfom Burkitt. Gripenberg și colab. (16) observă prezența unor cromozomi markeri prezentînd o constricție secundară pe brațul lung, care se deosebeau însă ca dimensiuni totale, precum și în ceea ce privește mărimea segmentului terminal de markerii C ai lui Kohn și colab. (23). Specificitatea acestui cromozom este negată și de Amano și colab. (2) și Whang-Peng și colab. (58), care au examinat linii celulare infectate *in vitro* cu virus EB. Autorii

Scanned with OKEN Scanner

consideră că markerii C, care apar inconstant, nu prezintă constricții secundare adevărate, ci lacune sau rupturi incidentale. Dealtfel, Huang și colab. (18) și Macek și colab. (27) au remarcat prezența unor markeri similari în celulele unor linii lipsite de virus EB. Se pare că celulele cu cromozomi markeri sau cu trisomii sînt favorizate *in vitro*, fapt demonstrat de creșterea frecvenței clonelor cu asemenea anomalii în urma pasajelor repetate (27).

c) Un cromozom acrocentric lung, de mărimea brațelor lungi ale unui cromozom nr. 2, a fost observat în linia SL1 (32), EB4 (6), precum și în unele limfoame primare (16, 20).

d) Majoritatea tumorilor Burkitt prezintă o origine clonală (14). O excepție remarcabilă o constituie cazul examinat de Gripenberg și colab. (16). Pacientul prezenta tumori faciale bilaterale cu metastaze în ganglionii cervicali. Constituția citogenetică a celor două tumori era deosebită, iar celulele metastatice reproduceau tabloul cromozomial al tumorilor primare homolaterale. Este posibil ca tumorile să fi avut o origine comună, diferențele observate fiind rezultatul unui proces de evoluție care a avut loc după constituirea tumorii contralaterale. Nu se poate exclude însă nici posibilitatea ca una din tumori să fi fost rezultatul unei noi inducții, cu atît mai mult cu cît tumorile și-au păstrat individualitatea cariologică.

Apariția tehnicilor de bandare a demonstrat însă că multe din rezultatele menționate vor trebui reevaluate. Astfel, Steel (51) a arătat că markeri aparent identici din punct de vedere morfologic erau rezultatul unor procese translocaționale diferite și conțineau deci un material genetic propriu. Utilizînd o tehnică de bandare, Manolov și Manolova (28) au demonstrat, în 5 din 6 biopsii tumorale și în 7 din 9 linii celulare examinate, prezența unei benzi suplimentare pe unul din cromozomii nr. 14. Dacă această descoperire va fi confirmată, limfomul Burkitt ar constitui o nouă afecțiune în care se individualizează o modificare cromozomială specifică.

BIBLIOGRAFIE

1. ADAM M., THORBURN J., GIBBS W. N. și colab. — *Brit. J. Cancer*, 1970, 24, 266.
2. AMANO K., SHIGETA S., AWANO I., HINUMA Y. — *Gann*, 1973, 64, 309.
3. BAKER M. C., ATKIN N. B. — *Brit. med. J.*, 1965, *i*, 770.
4. BAUKE J., SCHÖFFLING K. — *Cancer*, 1968, 22, 686.
5. BERGER R., PARMENTIER C. — *Nouv. Rev. franç. Hémat.*, 1971, *11*, 261.
6. BISHUN N. P., SUTTON R. N. P. — *Brit. J. Cancer*, 1967, *21*, 675.
7. BROUET J. C., FLANDRIN G., SELIGMAN M. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1973, 276, 247.
8. COUTINHO V., BOTTURA C., FALCAO R. P. — *Brit. J. Cancer*, 1971, 25, 789.

Scanned with OKEN Scanner

10. MODIFICĂRILE CROMOZOMIALE DIN TUMORILE UMANE MALIGNE

10.1. Introducere

Deşi numărul publicaţiilor referitoare la tumorile umane este foarte mare, datele existente sînt inegale şi incomplete. Unele tumori, îndeosebi acelea însoţite de apariţia exsudatelor maligne (tumorile ovariene şi mamare), au fost studiate în mod preferenţial. Deşi Slot (215) nu a observat diferenţe cariotipice între celulele din tumorile primitive ovariene şi celulele din exsudate, nu este sigur dacă celulele metastatice reflectă, în toate cazurile, constituţia citogenetică a tumorilor de origine. Există mai puţine date asupra tumorilor cu ritm lent de creştere, care prezintă un indice mitotic mai redus şi, implicit, un număr mai mic de mitoze analizabile. Din aceleaşi motive, cunoştinţele referitoare la tumorile benigne sînt extrem de fragmentare. Aplicarea noilor tehnici de bandare care permit identificarea exactă a tuturor cromozomilor este deocamdată limitată, deoarece calitatea adesea nesatisfăcătoare a metafazelor nu corespunde exigenţelor acestor metode. Utilizarea culturilor de celule oferă posibilitatea obţinerii unui număr apreciabil de mitoze. S-a demonstrat însă că în culturi se realizează selecţia anumitor tipuri de celule, mai bine adaptate condiţiilor *in vitro*; rezultatele obţinute cu această metodă nu ar reflecta deci constituţia citogenetică reală a tumorilor.

În acest capitol vor fi prezentate caracteristicile cromozomiale ale principalelor tumori umane. O discuţie mai generală asupra semnificaţiei modificărilor cromozomiale din tumori va fi redată în ultimul capitol al volumului.

10.2. Aparatul respirator

Deşi tumorile aparatului respirator reprezintă, datorită frecvenţei lor, una din principalele forme de neoplazii, numărul cazurilor analizate este destul de mic, iar în majoritatea publicaţiilor au

Scanned with OKEN Scanner

fost prezentate date referitoare la constituția citogenetică a celulelor metastatice prezente în exsudate.

În carcinoamele laringiene a fost remarcată prezența aneuploidiei și a cromozomilor markeri (260).

Într-un *carcinoid bronșic* (73, 74), numărul modal a fost de 45, cu o distribuție anormală a cromozomilor în grupele sistemului Den-

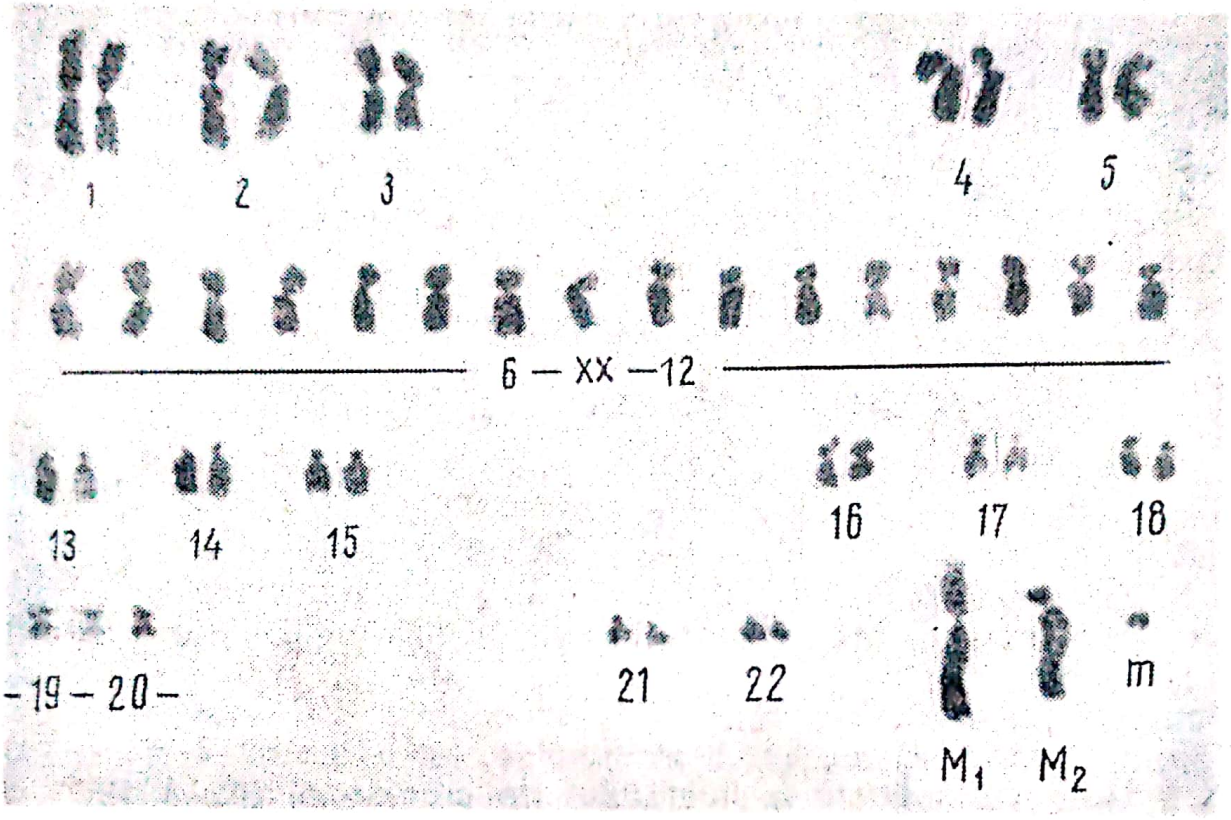


Fig. 43 — Cariotipul unei celule cu 47 de cromozomi și un cromozom „minute" (m) într-un caz de cancer pulmonar. Se remarcă prezența a 2 cromozomi markeri: un submetacentric lung (M1) și un subtelocentric lung (M2).

ver. Într-un *adenom bronșic cilindromatos* cu semne de invazie locală, celulele aveau 46 de cromozomi, dintre care 3 cromozomi markeri (74, 75).

În *carcinoamele pulmonare* (35, 59, 63, 110, 111, 115, 132, 147, 176, 209, 224) au fost observate numere modale situate în regiunea triploidă-tetraploidă. Au fost semnalați cromozomi markeri acrocentrici lungi (63, 110, 132), submetacentrici și metacentrici lungi (132, 176, 209), cromozomi inelari (140) și corpusculi cromatinieni dubli (59) (fig. 43).

Studiile citogenetice au fost completate cu *cercetări microspectrofotometrice* care au relevat date interesante, referitoare în special la conținutul în ADN al nucleilor din leziunile precanceroase. În mucoasa bronșică metaplazică predomină o populație celulară cu

nuclei diploizi. În comparație cu mucoasa normală, există însă un număr considerabil de nuclei hiperdiploizi. Aceștia provin, probabil, din celule care sintetizează ADN în vederea mitozei (fiind deci o expresie a activității proliferative crescute în epiteliul metaplazic), dar este posibil ca unele celule să conțină o cantitate anormală, aneuploidă de ADN. Adenoamele bronșice se deosebesc de epiteliul bronșic normal prin prezența unui număr mare de celule hiperdiploide (98). În carcinoamele bronșice, conținutul de ADN din nuclei este considerabil crescut și există o dispersie largă a valorilor față de cifra modală. Conținutul în ADN este mai mic în carcinoamele anaplazice cu celule mici decît în carcinoamele pavimentoase și în adenocarcinoame (1, 98).

10.3. **Aparatul digestiv**

10.3.1. Cavitatea bucală și esofagul

Există foarte puține date referitoare la *tumorile cavității bucale*. Atkin și Richards (25), utilizînd tehnica microspectrofotometriei, au constatat existența unui conținut aneuploid de ADN în nucleii celulelor provenite din carcinoamele limbii și mucoasei bucale. Von Ertl și colab. (71) au observat o distribuție largă a numărului de cromozomi în 3 carcinoame ale cavității bucale menținute în cultură. Makino și colab. (147) au examinat 4 carcinoame ale maxilarului: trei cazuri au fost hipertriploide, iar al patrulea a prezentat o mare variabilitate a numărului de cromozomi (63–104).

Tumorile benigne ale *glandelor salivare* prezintă valori modale diploide ale conținutului de ADN din nuclei (44, 125). Carcinoamele bine diferențiate au prezentat o distribuție a ADN nuclear similară cu cea din tumorile mixte benigne, în timp ce carcinoamele nediferențiate au valori aneuploide ale ADN din nuclei (125).

Un carcinom bine diferențiat al *esofagului* a prezentat un număr modal hipodiploid (42–43 de cromozomi) și doi cromozomi markeri (un acrocentric și un submetacentric lung) (144).

10.3.2. Stomacul

Majoritatea cercetărilor se referă la constituția citogenetică a celulelor din exsudatele consecutive cancerelor gastrice, dar există și cîteva publicații în care a fost investigată tumoarea primitivă.

Distribuția *numerelor de cromozomi* din celule este extrem de largă, iar valoarea *numerelor modale* este de asemenea foarte varia-

Scanned with OKEN Scanner

bilă, fiind cuprinsă între 40 și 120 de cromozomi (30, 108–111, 113, 147, 150, 171, 176, 221). Cercetările microspectrofotometrice au evidențiat, în 70% din tumori, valori medii ale ADN nuclear cuprinse între hiperdiploidie și hipotetraploidie (107, 184).

În unele tumori au fost observați *cromozomi markeri* acrocentrici lungi (109), metacentrici mari (171, 176) sau inelari (113), dar nu există nici o indicație asupra specificității lor (fig. 44).

Van Steenis (239) a analizat *repartizarea cromozomilor în diferitele grupe ale sistemului Denver*, comparînd numărul de cromozomi dintr-o anumită grupă (exprimat procentual față de numărul total de cromozomi din celulă) cu valorile caracteristice celulelor normale. S-a observat o creștere semnificativă a numărului de cromozomi din grupa C, în timp ce grupele D și G conțineau un număr redus de cromozomi. Van Steenis a presupus că excesul de cromozomi din grupa C ar rezulta dintr-un proces de fuziune centrică între cromozomii acrocentrici din grupele D și G.

Celulele susă manifestă o deosebită *stabilitate* a numărului de cromozomi, deși în unele cazuri au fost observate modificări spontane ale numărului modal (216). Tratamentul cu citostatice și radioterapia nu par să afecteze constituția citogenetică a celulelor susă (211, 236), dar pot restrînge întrucîtva variabilitatea numerelor de cromozomi, eliminînd celulele cu o poliploidie excesivă.

Nu a fost observată existența unei corelații între aspectul histopatologic al tumorilor și constituția lor citogenetică.

10.3.3. Colonul, cecul, apendicele și rectul

Există numeroase cercetări asupra constituției citogenetice a *tumorilor maligne ale intestinului gros* (15, 34, 70, 109, 110, 144, 145, 150, 171, 176, 206, 208, 259, 260), multe din ele referindu-se la tumorile primitive. Bazat pe analiza a 170 de tumori maligne (dintre care 119 carcinoame studiate în propriul său laborator), Atkin (15) a individualizat următoarele *trăsături generale: a*) toate celulele maligne sînt aneuploide. Numerele modale sînt situate de preferință în regiunea diploidă (40–50 de cromozomi) și triploidă (60–75 de cromozomi); b) aspectul cariotipurilor dintr-o anumită tumoare demonstrează apartanența celulelor la o clonă comună; *c*) studiul distribuției cromozomilor în grupele sistemului Denver relevă un număr redus de cromozomi în grupele B, D și G; *d*) adesea sînt prezenți cromozomi markeri lungi, dar ei nu prezintă trăsături specifice; e) există aceleași modificări cromozomiale în diferitele regiuni ale unei tumori, precum și în tumorile primitive și în metastazele lor.

Scanned with OKEN Scanner

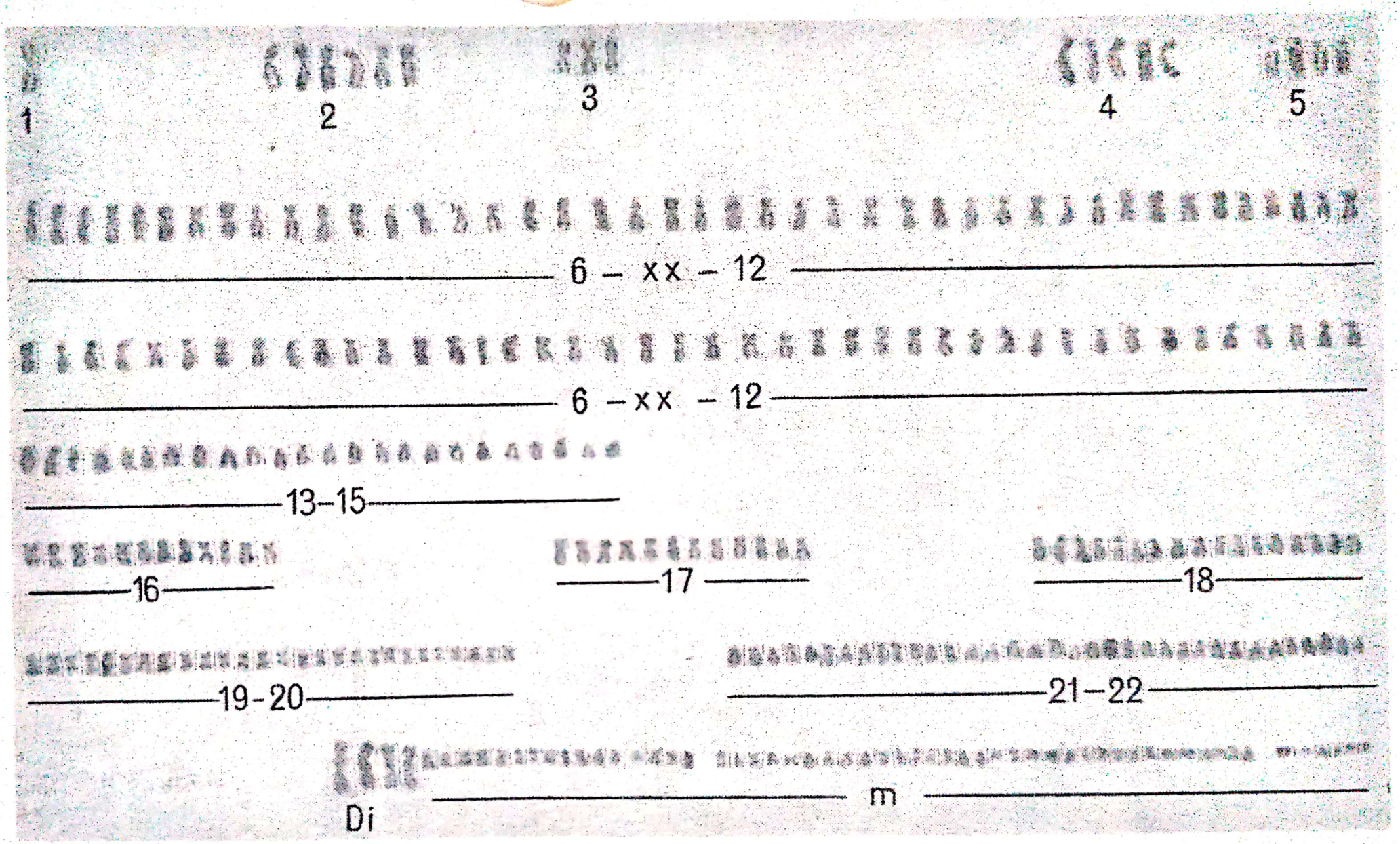


Fig. 44 — Cariotipul unei celule cu 235 de cromozomi și 56 de cromozomi „minute" (m) într-un caz de cancer gastric. Se remarcă prezența a 4 cromozomi dicentrici (Di).

Scanned with OKEN Scanner

Într-un caz de *carcinoid* care prezenta trăsături histologice sugestive pentru malignitate am observat un număr modal de 58 de cromozomi (191).

Datele referitoare la *polipii intestinului gros* sînt destul de puțin numeroase, deși studiul citogenetic al leziunilor premaligne are o importanță deosebită pentru înțelegerea modului în care se dezvoltă populațiile celulare anormale care caracterizează carcinoamele invazive. Cunoștințele existente se pot sistematiza astfel: *a*) majoritatea polipilor adenomatoși fără atipie histologică prezintă cariotipuri diploide (70, 171, 176) sau deviații minore (hiperdiploidie cu prezența unor cromozomi supranumerari în grupa C sau D); *b*) în polipii adenomatoși cu atipie histologică minoră se observă anomalii numerice mai pronunțate ale cromozomilor (34, 144, 145, 166); *c*) polipii cu atipie histologică majoră prezintă numere modale net aneuploide (70); *d*) din 16 polipi ai intestinului gros care prezentau modificări cromozomiale, în 13 cazuri a fost demonstrată afectarea cromozomilor din grupa C sau D. Această interesare selectivă demonstrează că deviațiile cariotipice din polipii colici nu sînt întîmplătoare (166).

Studiile citogenetice susțin astfel ipoteza dezvoltării secvențiale a leziunilor colice, conform schemei: polip adenomatos → adenom cu atipii → adenocarcinom (52). Prezența unor modificări cromozomiale în leziuni histologic benigne sugerează existența unui stadiu de „malignitate citogenetică", o noțiune care va fi discutată mai amplu în capitolul referitor la colul uterin.

10.3.4. Ficatul și pancreasul

Au fost examinate numai 4 tumori hepatice (111, 115, 150, 209) și o singură tumoare pancreatică (209). Toate cazurile au fost aneuploide și au prezentat cromozomi markeri.

10.4. **Aparatul genital masculin**

10.4.1. Tumorile testiculare

Marea majoritate a autorilor au studiat tumorile testiculare, astfel că în prezent există date asupra constituției citogenetice a 70 de cazuri.

Studiul *numerelor modale* a relevat existența unei deosebiri între seminoame și teratoame. Majoritatea seminoamelor prezintă numere

Scanned with OKEN Scanner

modale situate în regiunea hipotriploidă-hipertetraploidă (69–94 de cromozomi), în timp ce teratoamele au de obicei numere modale hiperdiploide (53–65 cromozomi) (18, 40, 78, 89, 168, 169, 197, 203). În unele seminoame au fost observate și celule diploide, provenite probabil din limfocitele care infiltrează adesea aceste tumori (169).

Seminoamele sînt uniforme din punct de vedere citogenetic, celulele aceleiași tumori avînd cariotipuri identice sau foarte asemănătoare. Dimpotrivă, în teratoame există deviații mari față de valorile numerice modale, iar celulele aceleiași tumori prezintă cariotipuri foarte diferite.

În majoritatea tumorilor testiculare a fost remarcată prezența unui *cromozom marker* subtelocentric sau submetacentric lung. După Martineau (169), el ar putea rezulta dintr-o inversie pericentrică a cromozomului nr. 2 sau dintr-o translocație pe brațul lung al unui cromozom din grupa B. Dimensiunea și aspectul morfologic al cromozomului marker variază întrucîtva de la caz la caz, ceea ce pledează împotriva specificității sale. Problema originii și sepcificității acestui cromozom va putea fi însă rezolvată defintiv numai cu ajutorul tehnicilor de bandare, care pot evidenția segmentele genetice din care este constituit markerul.

În unele teratoame a fost observată prezența concomitentă a unei particule de cromatină sexuală și a unui corpuscul Y fluorescent. Aceste date sînt compatibile cu originea teratoamelor din celule diploide totipotențiale (13).

10.4.2. Tumorile prostatice

În cazul carcinoamelor prostatei a fost remarcată o corelație netă între eficiența tratamentului cu estrogeni și nivelul ploidiei: tumorile diploide și tetraploide au răspuns bine la tratament, iar supraviețuirea medie a pacienților a fost de 7,4 ani; tumorile triploide și hexaploide au fost în general insensibile la tratament, caracteristică reflectată într-o durată de supraviețuire de numai 4,1 ani (230).

10.5. **Aparatul genital feminin**

10.5.1. Glanda mamară

Numărul tumorilor mamare studiate din punct de vedere citogenetic este destul de mare, dar majoritatea cercetărilor au fost efectuate asupra celulelor prezente în exsudate. Informațiile asupra

Scanned with OKEN Scanner

leziunilor benigne sînt foarte fragmentare. Toews și colab. (235) au examinat 4 hiperplazii chistice benigne și au observat numai cariotipuri diploide. Într-un fibroadenom gigant la o pacientă în vîrstă de 19 ani am evidențiat prezența a două linii celulare: celulele primei linii au prezentat 46 de cromozomi și cariotipuri diploide; celulele celei de a doua linii au conținut 47 de cromozomi, supranumerarul aparținînd grupei F (190). Aceeași anomalie a fost observată într-un carcinom lobular *in situ* (235).

În funcție de numărul lor modal, se deosebesc două clase mari de *carcinoame mamare*: tumori peridiploide și tumori cu numere modale triploide-tetraploide (35, 47, 48, 88, 99, 100, 109, 110, 120, 147, 176, 188, 189, 209, 224). În grupa peridiploidă predomină tumorile hipodiploide, în timp ce majoritatea tumorilor cu numere modale înalte au 60–85 de cromozomi (15).

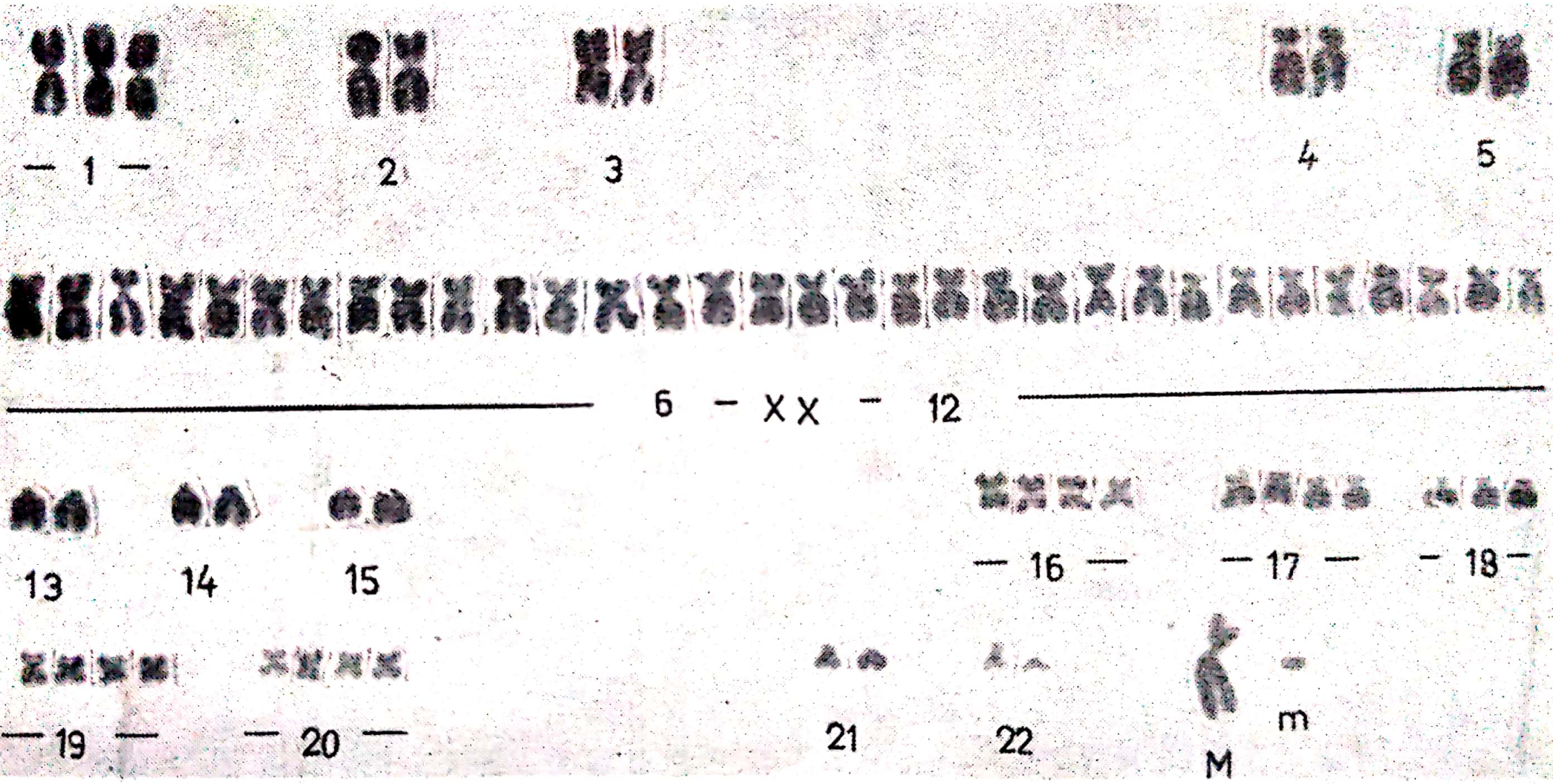
Cromozomii markeri apar destul de frecvent. În seria examinată de noi (188, 189), 83% din cazuri prezentau cromozomi markeri. Aspectul cromozomilor markeri este variabil: subtelocentrici și submetacentrici lungi, acrocentrici lungi, cromozomi dicentrici și inelari, cromozomi „minute" (fig. 45). Uneori, cromozomii markeri lungi pot fi observați și în nucleii interfazici, sub forma unor proeminențe care ies din conturul nuclear (20, 105).

Au fost semnalate numai două carcinoame mamare cu cariotip diploid: prima pacientă a prezentat un carcinom ductal invaziv relativ bine diferențiat (235); în cel de al doilea caz a fost examinată metastaza ganglionară a unui carcinom mamar (176), iar posibilitatea ca metafazele diploide să fi derivat din limfocitele în diviziune nu poate fi exclusă. Trei alte cazuri au prezentat deviații minime, cariotipurile fiind pseudodiploide (43, 173, 189).

Cercetările microspectrofotometrice au demonstrat că în hiperplazia lactațională și în fibroadenoame, nucleii au un conținut diploid de ADN (69, 106). La pacientele cu hiperplazie chistică a mamelei, incidența cancerului mamar este de 1,7–6,5 ori mai mare decît la populația feminină martoră. Izuo și colab. (114) au remarcat că transformarea malignă interesează îndeosebi hiperplaziile chistice cu valori aneuploide ale ADN nuclear.

Cazurile de cancer mamar pot fi încadrate în două categorii: cu conținut peridiploid și cu conținut hiperdiploid-hipodiploid de ADN. Pacientele cu tumori peridiploide au un prognostic mai bun decît pacientele cu tumori tetraploide. Supraviețuirea după 8 ani este de 54% pentru pacientele din prima grupă și de 25% pentru pacientele din grupa a doua (12).

Scanned with OKEN Scanner



ig. 45— Cariotipul unei celule cu 73 de cromozomi și un cromozom „minute" (m) într-un caz de cancer mamar. Se remarcă prezența unui cromozom marker submetracentric lung (M).

Scanned with OKEN Scanner

10.5.2. Ovarul

Constituția citogenetică a *carcinoamelor ovariene* a fost discutată în multe publicații (16, 18, 19, 22, 35, 38, 45, 61, 68, 72, 80, 81, 84–87, 93, 100, 101, 109–111, 121, 138, 150, 174, 178, 186–189, 196, 201, 214, 215, 217, 218, 233, 234, 237, 260), majoritatea referitoare la celulele din exsudate.

Atît studiul cromozomilor, cît și al conținutului în ADN nuclear (11) au demonstrat că valorile modale au tendința de a se grupa în regiunea peridiploidă și tetraploidă. Majoritatea tumorilor din grupa peridiploidă sînt hipodiploide, iar această tendință spre hipodiploidie, observată de numeroși autori, pare destul de caracteristică pentru tumorile ovariene. Atkin (11) a demonstrat că prognosticul la pacientele cu tumori hipodiploide este mai bun decît la pacientele cu tumori tetraploide.

Prezența cromozomilor markeri a fost semnalată în numeroase publicații. În seria noastră, care cuprinde 33 de carcinoame ovariene, 60% din cazuri au prezentat cromozomi markeri: submetacentrici și subtelocentrici lungi, acrocentrici lungi, cromozomi inelari (fig. 46) și dicentrici (fig. 47), cromozomi „minute" (188, 189). În seria examinată de Atkin (9), 19 din 20 de carcinoame ovariene au prezentat cromozomi markeri lungi, avînd dimensiuni egale sau superioare cromozomilor din grupa A. Astfel de cromozomi markeri au apărut în 78% din cazurile de carcinoame ovariene cu anomalii morfologice ale cromozomilor pe care le-am examinat, dar dimensiunile și aspectul lor sînt variabile, ceea ce sugerează o origine diferită și un conținut genetic diferit.

Numai 4 carcinoame ovariene au fost studiate cu tehnici de bandare (38, 81, 233). Tiepolo și Zuffardi (233) au remarcat o frecvență neașteptat de mare a cromozomilor markeri; o parte din ei ar fi fost considerați normali cu ajutorul tehnicilor clasice de colorație.

În unele carcinoame ovariene, deviațiile cromozomiale sînt minime (15). Două din cazurile pe care le-am examinat au prezentat cariotipuri diploide, deși examenul citologic a semnalat existența certă a celulelor maligne (189).

Majoritatea tumorilor ovariene, inclusiv cazurile cînd ambele ovare sînt afectate, au origine monoclonală (15). Prin evidențierea unor cromozomi markeri comuni am putut demonstra originea clonală a unui carcinom ovarian care prezenta trei linii celulare: o linie hipodiploidă (cu 37—38 de cromozomi), o linie triploidă (cu 66—75 de cromozomi) și o linie hexaploidă (cu 138 de cromozomi) (187).

Există foarte puține date referitoare la *tumorile ovariene benigne*. Fraccaro și colab. (85) au observat într-un chistadenom prezența unor

Scanned with OKEN Scanner

clone celulare cu 46, 47 și 48 de cromozomi; cromozomii supranumerari aparțineau grupei C. Într-un alt chistadenom au fost observate celule aneuploide și cromozomi markeri (37). S-a sugerat că prezența acestor anomalii ar indica un proces incipient de transformare malignă. Fadei și colab. (72) au evidențiat numai celule diploide în

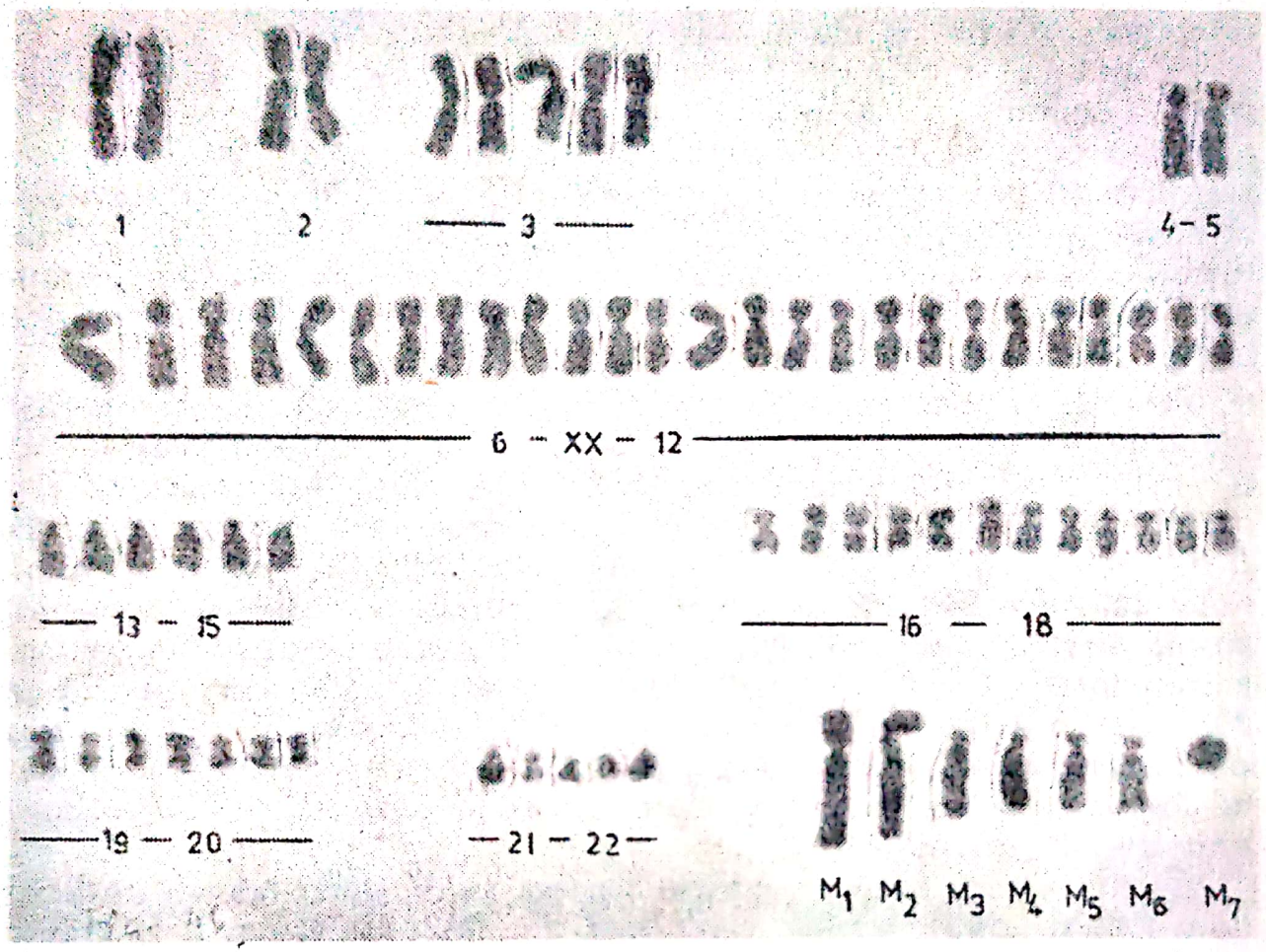


Fig. 46 — Cariotipul unei celule cu 74 de cromozomi într-un caz de cancer ovarian. Se remarcă prezența a 7 cromozomi markeri; un submetacentric (M1) și un subtelocentric lung (M2), 4 acrocentrici lungi (M3, M4, M5, M6) și un cromozom inelar (M7).

chistadenoamele papilifere benigne și în chistadenoamele papilifere cu malignizare incipientă.

Cercetările microspectrofotometrice au confirmat datele obținute prin studiul cromozomilor. Majoritatea tumorilor ovariene benigne au conținut diploid de ADN (19, 32, 250). Unele chistadenoame prezintă însă valori triploide de ADN (19). S-a sugerat că chistadenoamele cu valori aneuploide de ADN ar avea potențial evolutiv mai malign decît tumorile diploide sau peridiploide.

Teratoamele ovariene benigne studiate de Rashad și colab. (198) au prezentat numai cariotipuri diploide. Într-un alt teratom benign,

Scanned with OKEN Scanner

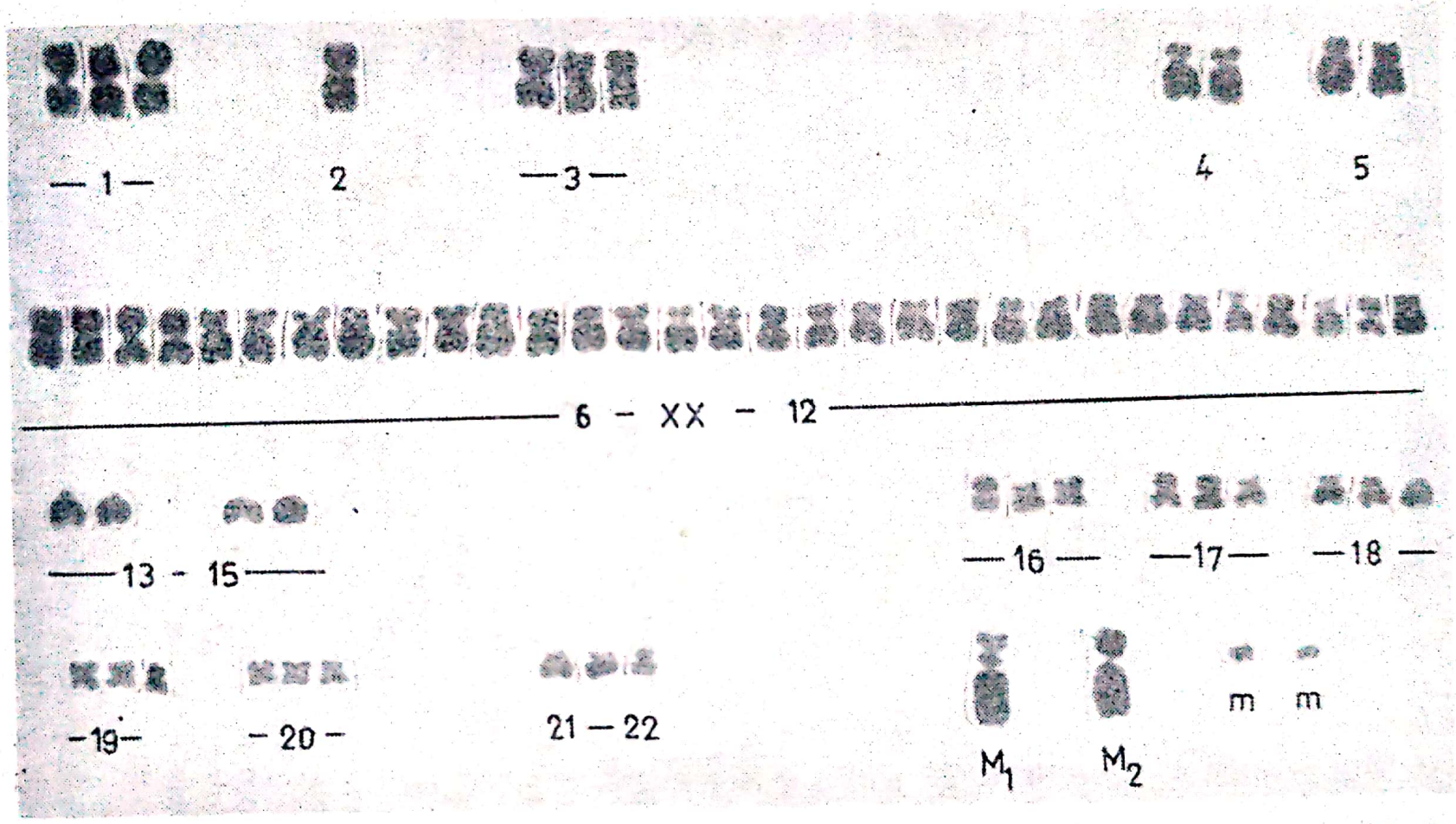


Fig. 47 — Cariotipul unei celule cu 66 de cromozomi și 2 cromozomi „minute" (m) într-un caz de cancer ovarian. Se remarcă prezența a 2 cromozomi markeri: un dicentric (M1) și un submetacentric lung (M2).

Scanned with OKEN Scanner

examinat de Serr și colab. (212), a fost observat un cromozom supranumerar în grupa C. Teratoamele maligne sînt hiperdiploide sau pseudodiploide (2, 234).

10.5.3. Colul uterin

Literatura consacrată este extrem de bogată (3–8, 17, 21, 24–29, 42, 46, 47, 50, 55, 65, 77, 79, 93, 95, 97, 116–118, 126–130, 143, 170, 182, 183, 195, 202, 205, 210, 222, 223, 225, 226, 228, 229, 240, 242, 243, 245–247). Acest fapt se explică pe de o parte prin accesibilitatea organului, care permite prelevarea unor biopsii repetate, iar pe de altă parte, prin patologia bogată a colului (displazii, carcinoame intraepiteliale, microcarcinoame, carcinoame invazive), care permite corelarea rezultatelor examinărilor citogenetice cu datele histopatologice și clinice.

Rezultatele publicate de diferiți autori nu sînt însă, întotdeauna, concordante. Unele diferențe sînt cauzate de interpretarea neunitară a examinărilor histopatologice, care face ca microfotografiile publicate de către un centru oncologic pentru a ilustra o displazie agravată să fie considerate de alți autori ca fiind sugestive pentru un carcinom intraepitelial. Alte diferențe sînt determinate de încercarea de a utiliza metafaze care au o calitate nesatisfăcătoare. Cu aceste rezerve, putem rezuma tabloul citogenetic al leziunilor colului uterin după cum urmează:

a) *Displazii.* Displaziile simple ale colului uterin prezintă de obicei numere modale diploide și cariotipuri diploide (129, 130). O excepție o constituie cele 4 cazuri publicate de Spriggs (225), în care majoritatea celulelor aveau numere tetraploide de cromozomi.

Observațiile microspectrofotometrice ale lui Brandao (46) și Wagner și colab. (240) au demonstrat de asemenea că în unele displazii simple nucleii prezintă valori aneuploide de ADN, sugerînd uneori chiar constituirea unor clone. Citofotometria permite astfel individualizarea unui grup de displazii simple cu conținut anormal de ADN în nuclei, care nu pot fi recunoscute pe baza trăsăturilor citologice sau histopatologice. Semnificația acestor displazii nu este cunoscută, dar este posibil ca ele să reprezinte forme de tranziție între leziunile benigne și maligne sau stadii deja maligne în momentul biopsiei (46).

Displaziile agravate prezintă destul de frecvent anomalii cromozomiale. Unele cazuri sînt hipodiploide (116); altele prezintă numere modale de cromozomi situate în regiunea triploidă-tetraploidă (225). Prezența cromozomilor markeri a fost semnalată în cîteva publicații

Scanned with OKEN Scanner

(116, 225). În statistica noastră, frecvența cazurilor de displazie care prezintă cromozomi markeri este de 14,4% (55, 126), cifră comparabilă cu datele lui Dehnhard (65), care a calculat o incidență de 17,7%.

b) *Carcinoamele intraepiteliale* au adesea numere modale situate în regiunea tetraploidă. O proporție destul de mare a carcinoamelor intraepiteliale prezintă însă dispersii largi ale valorilor numerelor de cromozomi din celule, fără tendință de grupare în jurul unui număr modal bine definit. În sfîrșit, alte cazuri prezintă valori modale peridiploide.

Cromozomii markeri (fig. 48) apar ceva mai frecvent, incidența lor fiind de 19,3% în statistica lui Dehnhard (65) și de 33,3% în seria noastră (126).

c) *Carcinoamele invazive* sînt adesea peridiploide, iar hipodiploidia este destul de frecventă. Un număr mai mic de cazuri sînt triploide sau hipotetraploide. Frecvența tumorilor cu cromozomi markeri este de 70% (65, 126).

Originea clonală a carcinoamelor cervicale este sugerată atît de observațiile citogenetice (care au demonstrat prezența unor anomalii cromozomiale similare în celulele provenite din aceeași tumoare) (5), cît și de studiile microspectrofotometrice (care au arătat prezența unor valori modale ale ADN caracteristice pentru fiecare tumoare) (7).

Semnificația datelor prezentate este încă incertă. O constatare extrem de interesantă este reprezentată de prezența anomaliilor citogenetice în displazii. Incidența cazurilor de displazie care prezintă modificări cromozomiale depășește frecvența cu care se bănuiește — pe baza datelor statistice — că displazia ar evolua spre malignizare. Se ridică astfel două ipoteze: fie că celulele anormale, deși maligne încă în acest stadiu („malignitate citogenetică"), nu progresează spre constituirea unui carcinom; fie că anomaliile cromozomiale ar reprezenta numai o etapă în lanțul de evenimente care duce la malignizare. Și într-o eventualitate, și în cealaltă, prezența anomaliilor cromozomiale ar indica însă posibilitatea unei evoluții maligne. Tehnicile cromozomiale, extrem de laboricase, nu vor putea fi utilizate pe scară largă. Microspectrofotometria a ajuns însă la un grad de automatizare suficient pentru a putea fi utilizată ca metodă de depistare, atrăgînd atenția asupra cazurilor suspecte (210).

O a doua problemă se ridică în legătură cu capacitatea de progresiune a carcinoamelor intraepiteliale spre carcinoame invazive. Dispoziția numerelor modale de cromozomi este diferită în cele două tipuri de leziuni, majoritatea carcinoamelor invazive fiind peridiploide, în timp ce majoritatea carcinoamelor intraeptieliale sînt peritetraploide. S-ar putea ca acele carcinoame intraepiteliale care au nu-

Scanned with OKEN Scanner

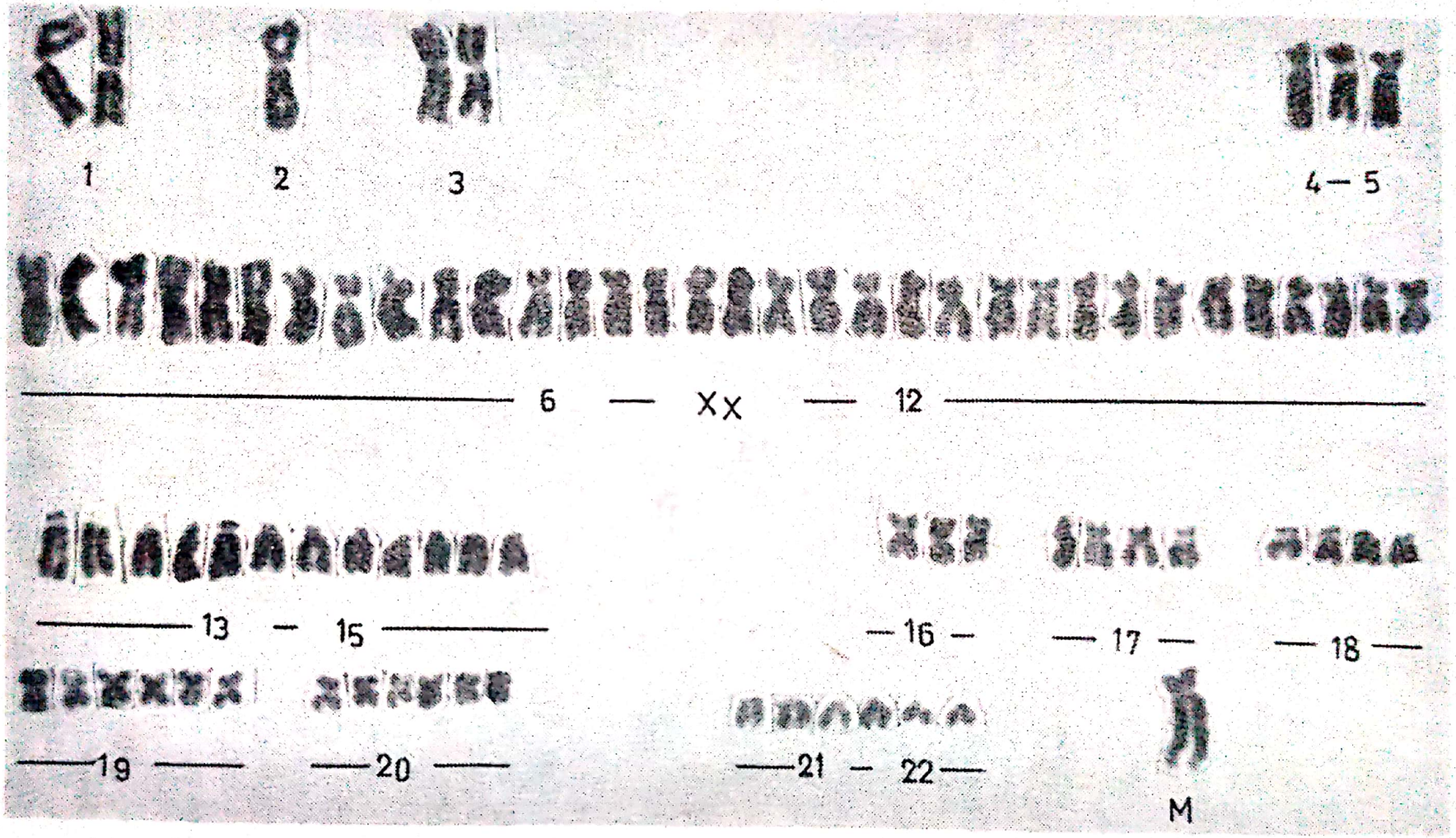


Fig. 48 — Cariotipul unei celule cu 83 de cromozomi într-un caz de carcinom intraepitelial al colului uterin. Se remarcă prezența unui cromozom marker subtelocentric lung (M).

Scanned with OKEN Scanner

mere modale similare cu ale carcinoamelor invazive (fiind deci peridiploide) să fie capabile de progresiune (128), celelalte cazuri regresînd (posibilitate verificată și citologic). Această supoziție este în acord cu datele lui Atkin (4), care a constatat că, prognosticul la carcinoamele cu celule mari (avînd deci un conținut tetraploid de ADN) este mai bun după radioterapie decît la carcinoamele cu celule mici.

Problema specificității modificărilor cromozomiale din leziunile colului uterin a preocupat numeroși autori. Auersperg și colab. (27, 28) au descris prezența unui cromozom marker de mărimea cromozomilor nr. 2, dar avînd centromerul dispus mai distal. Acest cromozom a fost denumit Api, deoarece s-a presupus că ar rezulta din inversia pericentrică a unui cromozom din grupa A. Markeri similari au fost evidențiați și de alți autori (42, 55, 202, 225, 247), dar ei nu pot fi considerați specifici. Multe cazuri de carcinoame nu prezintă cromozomi markeri; în alte cazuri au fost observați cromozomi acrocentrici lungi (5, 29, 55, 224, 225), cromozomi inelari (5, 29, 225), submetacentrici sau subtelocentrici lungi (17, 18, 55, 225) (fig. 49, 50).

Desigur, nu toate anomaliile cromozomiale se pot evidenția sub forma cromozomilor markeri. Deleţiile minore pot trece neobservate, iar unele translocații dau naștere unor cromozomi avînd trăsături morfologice similare cu ale cromozomilor normali, de care nu pot fi deosebiți. Cu această mențiune, putem considera că incidența mai mare a cromozomilor markeri în carcinoamele invazive în comparație cu carcinoamele intraepiteliale și cu displaziile este expresia vizibilă a unor rearanjamente structurale mai complexe ale cariotipului.

Unele din problemele pe care le-am menționat ar putea fi rezolvate cu ajutorul tehnicilor de bandare. Aplicarea lor este însă, cel puțin deocamdată, împiedicată de calitatea tehnică nesatisfăcătoare a metafazelor obținute din materialul cervical. Este însă sigur că în curînd vor fi imaginate tehnici noi, colul uterin oferind posibilitatea de studiere a rolului cromozomilor în carcinogeneză în condițiile unui „experiment natural".

10.5.4. Corpul uterin

Constituția citogenetică a endometrului normal a reprezentat pînă de curînd un subiect de dispută, întrucît unii autori au susținut că în endometrul normal ar exista numeroase celule poliploide. Lucrările de control ale lui Rask-Masden și Philip (199)

Scanned with OKEN Scanner

și Kawa și Klinger (123) au demonstrat însă că frecvența celulelor endometriale ale poliploidei nu depășește 5%.

Baker (33) a examinat 67 de chiuretaje uterine nemaligne, incluzînd hiperplazii endometriale și zone de epiteliu „atipic". Toate meta-

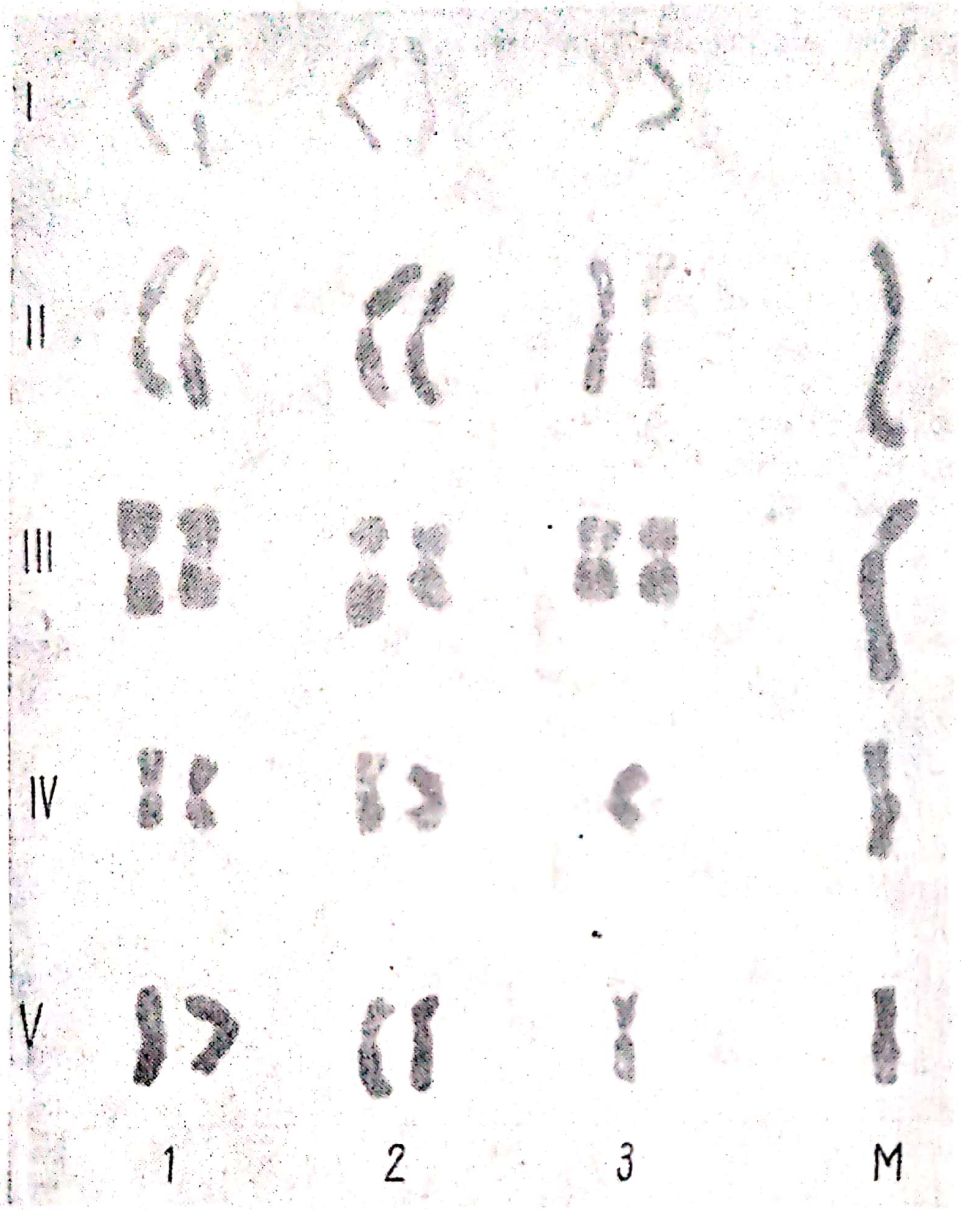


Fig. 49 — Montaj în care este prezentat aspectul cromozomilor markeri (M) din 5 carcinoame invazive ale colului uterin în comparație cu cromozomii perechilor nr. 1—3.

fazele analizate au fost diploide. Într-o hiperplazie endometrială atipică studiată de Stanley și Kirkland (227), majoritatea metafazelor au fost însă pseudodiploide.

Carcinoamele corpului uterin pot fi incadrate, în funcție de numărul lor modal, în două categorii: tumori peridiploide și tumori cu valori modale triploide-tetraploide (15, 49, 77, 119, 180, 238, 241).

Scanned with OKEN Scanner

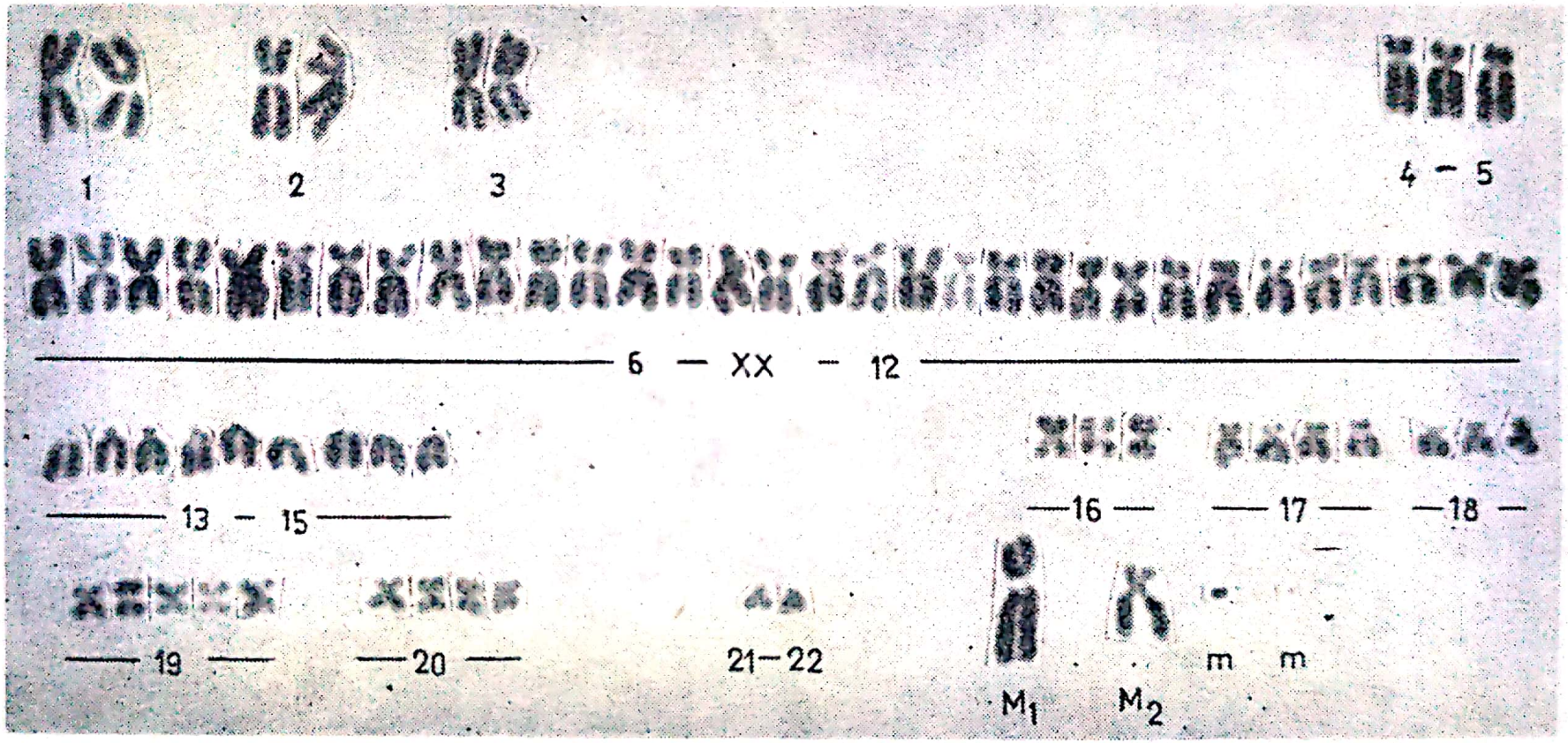


Fig. 50 — Cariotipul unei celule cu 73 de cromozomi şi 2 cromozomi „minute" (m) într-un caz de carcinom invaziv al colului uterin. Se remarcă prezenţa a 2 cromozomi markeri: un submetacentric (M1) şi un acrocentric lung (M2).

Scanned with OKEN Scanner

Tumorile bine diferențiate din punct de vedere histologic sînt adesea peridiploide. Ele prezintă deviații cariotipice minime, cum ar fi trisomia unui cromozom din grupa C sau D (33). În unele tumori sînt prezente mai multe linii celulare înrudite, sugerînd existența unui proces de evoluție clonală care duce la apariția unor modificări cromozomiale tot mai complexe. Tumorile nediferențiate din punct de vedere histologic, avînd proprietăți invazive și metastazante, prezintă de obicei numere modale situate în regiunea triploidă-tetraploidă și rearanjamente structurale ale cromozomilor.

Două carcinoame studiate de Tseng și Jones (238) și unul examinat de Baker (33) au prezentat o proporție mare de celule diploide. Examenul histopatologic a sugerat că aceste mitoze derivau din celulele tumorale.

10.5.5. Tumorile trofoblastice

Aspectele citogenetice ale molei hidatiforme, corioadenomului distructiv și corioepiteliomului au fost studiate cu intenția de a elucida istoria naturală a transformării maligne în țesutul trofoblastic.

Mola hidatiformă, care este stadiul cel mai precoce, prezintă de obicei numere modale diploide. Atunci cînd fătul are o constituție cromozomială anormală (triploidă sau mozaic diploid/triploid), mola poate prezenta modificări similare cu ale fătului (14, 23, 148, 149, 193). Progresiunea spre corioadenomul distructiv este însoțită de apariția unui număr crescut de celule aneuploide (149), care ajung să predomine tabloul citogenetic în cazul corioepitelioamelor.

Într-un corangiom, o tumoare vasculară puțin studiată a placentei, Kim și colab. (124) au observat numai metafaze diploide.

Studiul histofotometric al secțiunilor de țesuturi reprezintă o metodă extrem de valoroasă, deoarece permite corelarea informațiilor obținute prin determinarea cantității de ADN din nuclei cu aspectul histopatologic al cazurilor. Examinînd 3 cazuri de molă hidatiformă, un caz de corioadenom distructiv și 2 cazuri de coriocarcinom, Goldfarb și colab. (92) au observat că în general, valorile ADN din nucleii sincițiotrofoblastului sînt limitate la o distribuție diploidă-tetraploidă, în timp ce valorile ADN din nucleii citotrofoblastului sînt dispersate în regiunea tetraploidă-octoploidă. Cercetările asupra trofoblastului normal au demonstrat că sincițiotrofoblastul reprezintă compartimentul diferențiat al sistemului și că el derivă din citotrofoblast, care formează compartimentul generator. În tumorile trofoblastice, distribuția mai restrînsă a valorilor ADN din sincițiotrofoblast îm compara-

Scanned with OKEN Scanner

ție cu citotrofoblastul sugerează că numai anumite celule tumorale ale citotrofoblastului contribuie la formarea sinciţiotrofoblastului. Aceste celule derivă probabil din linia susă a citotrofoblastului şi, datorită proprietăţilor lor proliferative deosebite, alcătuiesc compartimentul diferenţiat. Celelalte celule citotrofoblastice sînt probabil lipsite de capacitatea de a se divide continuu.

10.5.6. Alte tumori ale aparatului genital feminin

În 3 carcinoame ale *trompei Fallope* au fost observate numere modale de 74, 42 şi 82–84 de cromozomi (60, 93, 248) şi prezenţa unor cromozomi markeri.

Carcinoamele spinocelulare ale *vaginului* prezintă aneuploidie şi cromozomi markeri (92, 246). Un caz de boală Bowen a vaginului a prezentat un număr modal de 56–59 de cromozomi (147).

În carcinoamele invazive şi *in situ* ale *vulvei* (122, 172, 246) a fost observată, spre deosebire de condiloamele acuminate şi de boala Paget (122, 258), existenţa aneuploidiei şi prezenţa unor cromozomi markeri.

10.6. **Aparatul urinar**

Există puţine articole în care au fost publicate detalii asupra constituţiei citogenetice a tumorilor aparatului urinar. Informaţii suplimentare au fost însă obţinute prin aplicarea tehnicilor microspectrofotometrice.

10.6.1. Rinichii

Cox (57) a examinat 7 nefroblastoame la copii. În mod surprinzător, 3 pacienţi au prezentat numai cariotipuri diploide. La alţi doi bolnavi, pe lîngă celulele diploide au fost evidenţiate şi celule hiperdiploide, cu cromozomi suplimentari în grupa A şi respectiv C. Cazul al şaselea a fost pseudodiploid: toate celulele au conţinut 46 de cromozomi, dar un cromozom A1 lipsea, în timp ce în grupa C a fost observat un cromozom suplimentar. În ultimul caz, mitozele au fost aneuploide, majoritatea celulelor avînd 55–58 de cromozomi.

Scanned with OKEN Scanner

10.6.2. Vezica urinară

În cazul vezicii urinare a fost evidențiată o corelație interesantă între gradul de diferențiere histologică a tumorilor și caracteristicile lor citogenetice. Carcinoamele bine diferențiate ale vezicii, care nu prezintă semne de invazie, au în general numere modale peridiploide (74, 220). În tumorile cu o diferențiere moderată au fost observate cifre modale peritetraploide și peridiploide (76, 136). Există o relație între nivelul ploidiei și capacitatea invazivă: în tumorile cu cifre modale peridiploide nu a fost observată invazia mucoasei, în timp ce tumorile care au invadat mucoasa au prezentat cifre modale peritetraploide (136). Carcinoamele nediferențiate sînt adesea hipotetraploide, dar prezintă o dispersie mai mare a numerelor de cromozomi față de valoarea modală decît carcinoamele bine și moderat diferențiate (136).

Prezența cromozomilor markeri a fost notată în mai multe publicații (74, 76, 136, 260), însă originea și semnificația lor nu sînt cunoscute.

Într-o tumoare de un tip histologic special — un rabdomiosarcom al vezicii urinare la o fetiță în vîrstă de 3 luni — Cox (58) a observat un număr modal de 46 și o constituție diploidă în 9 din 12 cariotipuri examinate.

Rezultatele cercetărilor citogenetice au fost confirmate de studiile microspectrofotometrice, care au arătat că progresiunea de la stadiul de tumoare papiliferă bine diferențiată la stadiul de carcinom invaziv nediferențiat este însoțită de o modificare a conținutului de ADN din nuclei de la valori modale diploide la valori poliploide (56, 142). Predominanța celulelor diploide și tetraploide semnifică o evoluție clinică mai „benignă", în timp ce tumorile mai „maligne" prezintă celule cu valori triploide și hexaploide ale ADN nuclear (83). Supraviețuirea medie după intervenția chirurgicală a fost de 33,6 luni la pacienții cu tumori diploide și tetraploide și de numai 18,1 luni la pacienții cu tumori triploide și hexaploide (230).

10.7. **Sistemul nervos**

Există astăzi date referitoare la constituția citogenetică a 250 de tumori ale sistemului nervos, dintre care aproape jumătate sînt meningioame. Studiul acestor tumori este important datorită unor particularități citogenetice care oferă posibilitatea de a investiga tabloul cromozomial în tumori cu aspecte histopatologice benigne, evoluția modificărilor cromozomiale și rolul lor posibil în carcinogeneză.

Scanned with OKEN Scanner

10.7.1. Glioamele cerebrale

Mark a analizat serii mari de glioame la copii (155) și adulți (156). Date asupra unor cazuri izolate au fost publicate și de alți autori (41, 59, 102, 134, 141, 146, 164, 167, 207, 224, 244, 251, 254). Rezultatele acestor cercetări au permis o apreciere destul de completă a modificărilor cromozomiale din diferitele tipuri de glioame (162).

Majoritatea *astrocitoamelor* prezintă numere modale diploide sau peridiploide. Analiza cariotipică a demonstrat însă în toate cazurile, deviații ale repartizării cromozomilor în grupele sistemului Denver, manifestate prin scăderea proporției cromozomilor din grupele D și C și, mai puțin frecvent, a cromozomilor A1.

Au fost observate diferite tipuri de cromozomi markeri, corpusculii cromatinieni dubli fiind cei mai caracteristici. Aspectul corpusculilor cromatinieni dubli variază de la o tumoare la alta și de la o celulă la alta, în cadrul aceleiași tumori. De obicei au aspectul unor structuri alcătuite din două puncte alăturate. Anomalia apare destul de frecvent în tumorile nervoase, dar a fost semnalată în mod excepțional și în alte tipuri de tumori.

În *oligodendroglioamele* bine diferențiate au fost observate anomalii cromozomiale minime. În tumorile mai imature, deviațiile cromozomiale sînt mai importante.

Unele *ependimoame* sînt alcătuite numai din celule anormale. Altele, prezintă și o proporție variabilă de celule diploide.

Mark (158) a publicat detalii asupra constituției citogenetice a 7 *neurinoame*. Trei tumori au prezentat numere modale și cariotipuri diploide. Celelalte patru au fost formate din celule diploide sau hipodiploide. În trei cazuri au fost evidențiați cromozomi markeri. Un neurosarcom a prezentat deviații extinse (celule hipotetraploide, conținînd 12–14 markeri).

10.7.2. Meningioamele

În anul 1967, Zang și Singer (261) au atras atenția asupra faptului că în meningioame – tumori cu un aspect histopatologic și un comportament clinic benign – există o anomalie cromozomială destul de constantă: lipsa unui cromozom din grupa G. Studii recente, efectuate cu ajutorul tehnicilor de bandare, au demonstrat afectarea selectivă a perechii G22 (165, 194, 265).

Scanned with OKEN Scanner

Mark a discutat recent rezultatele cercetărilor efectuate asupra 105 meningioame (dintre care 50 provenite din laboratorul autorului), subliniind următoarele aspecte:

a) *Numărul modal.* Din cele 105 meningioame, 33% au prezentat numere modale diploide, iar 60% au fost hipodiploide. Restul tumorilor au fost hiperdiploide (153, 213, 263), o singură tumoare fiind hipotriploidă (161). Tendința spre hipodiploidie reprezintă trăsătura cea mai caracteristică a meningioamelor și ea demonstrează că o scădere a numărului de cromozomi poate fi bine tolerată (163).

b) *Analiza celulelor modale.* Cele mai multe tumori au fost caracterizate printr-o monosomie G (datorită pierderii unui cromozom nr. 22). Tumorile cu cariotip normal sînt, de asemenea, destul de frecvent întîlnite. Zankl și colab. (262) au remarcat că unele tumori prezintă o pierdere preferențială a cromozomilor sexuali.

c) *Cromozomii markeri.* Benedict și colab. (36), care au observat prezența unor cromozomi markeri într-un meningiom care ulterior a recidivat, presupun că prezența unei aneuploidii accentuate și/sau a cromozomilor markeri ar indica malignitatea, chiar dacă tabloul histologic este benign. Ulterior, s-a demonstrat însă că frecvența cazurilor de meningioame care prezintă cromozomi markeri este destul de ridicată (28,8%), în absența unor semne clinice sau histopatologice de malignitate.

Un interes deosebit îl prezintă evidențierea unui cromozom de „tip Ph^1" (241), rezultat din deleția unui cromozom din grupa G. Mark și colab. (165) presupun că deleția unui cromozom nr. 22 ar putea reprezenta modificarea inițială în toate meningioamele. În unele meningioame, cromozomul 22 anormal ar fi menținut ca atare, în timp ce în altele, cromozomul marker este pierdut. Au fost observați și alți cromozomi markeri, inclusiv cromozomi dicentrici și inelari (159, 160, 163).

În unele culturi de celule umane transformate de virusul simian 40 (SV40) au fost observate modificări cromozomiale asemănătoare cu cele din meningioame, constînd îndeosebi în lipsa unui cromozom acrocentric mic. Pornind de la aceste constatări, Weiss și colab. (249) au investigat prezența antigenelor induse de virusul SV40 în 7 meningioame. În cele 3 meningioame în care au fost evidențiate antigene virale, a fost observată lipsa unui cromozom G (însoțită în două cazuri de lipsa altor cromozomi). Meningioamele în care nu au putut fi detectate antigene virale, au prezentat cariotipuri diploide. Pe baza acestor rezultate s-a sugerat existența unei corelații între meningioame și virusul SV40. Sînt însă necesare studii suplimentare pentru a stabili dacă virusul este un agent cauzator al meningioamelor umane.

Scanned with OKEN Scanner

10.8. **Glandele endocrine**

Adenoamele hipofizare sînt tumori benigne, dar care pot prezenta uneori un caracter invaziv local. În contradicție cu aspectul histopatologic benign, 5 din cele 7 tumori examinate de Mark (157) au prezentat anomalii cromozomiale. Celulele modale au fost dispuse în regiunea diploidă în 3 cazuri și în regiunea triploidă în 2 cazuri. Într-o tumoare a fost observat un cromozom marker.

Într-o cultură de carcinom metastatic *tiroidian* au fost obținute numai metafaze diploide (derivate probabil din celulele reactive ale gazdei) (177). Sokolow și colab. (219) au examinat un carcinom și 5 tumori benigne ale glandei tiroide. Celulele adenocarcinomului au prezentat 55–58 de cromozomi. În adenoamele tiroidiene a fost evidențiat un număr modal de 46 de cromozomi; un procent variabil de celule prezenta însă anomalii numerice.

10.9. **Tumori oculare**

Singurele tumori oculare studiate din punct de vedere citogenetic sînt retinoblastoamele. Lele și colab. (139) au remarcat deleția brațului lung al unui cromozom din grupa D; această anomalie a fost observată nu numai în țesutul tumoral, ci și în culturile de țesut conjunctiv și în celulele sanguine. Cazul analizat de Mark (154) prezenta un număr modal de 47 de cromozomi, dintre care 3 cromozomi markeri, și un număr variabil de corpusculi cromatinieni dubli. Kobayashi și colab. (131) au studiat 7 retinoblastoame; în 5 cazuri a fost remarcată o incidență mare a celulelor poliploide. Reid și colab. (200) au examinat caracteristicile unei linii de retinoblastom menținute *in vitro* timp de 36 de luni; studiul citogenetic a relevat un număr modal hipertriploid și prezența unor corpusculi cromatinieni dubli.

Un fenomen extrem de interesant îl constituie frecvența mare a retinoblastoamelor la bolnavii care prezintă o deleție congenitală a brațului lung al unui cromozom din grupa D (90, 94, 183, 192, 231, 232, 255, 256). Cercetările recente ale lui Wilson și colab. (256) au stabilit că cromozomul implicat este un membru al perechii 13, iar deleția este de tip interstițial. Alături de retinoblastom, pacienții prezintă întîrziere mintală, defecte scheletice (micrognație, anomalii ale degetelor), boli cardiace congenitale, asimetrie facială cu urechi jos implantate și anus imperforat, simptome care, în totalitate alcătuiesc sindromul de deleție 13q-. Retinoblastoamele au mai fost observate

Scanned with OKEN Scanner

la pacienţi cu trisomie 21 (51, 64). Există însă şi cazuri de retinoblastoame apărute la indivizi fără anomalii cromozomiale (135). Czeizel şi colab. (62) au observat o incidenţă înaltă a aberaţiilor cromozomiale (lacune şi rupturi de tip cromatidic şi cromozomial, deleţii) în limfocitele unor pacienţi cu retinoblastom. Aceste date sugerează existenţa a două tipuri de retinoblastoame: tumori apărute în cadrul sindromului de deleţie 13q- şi tumori apărute pe un teren de instabilitate cromozomială, al cărui rol predispozant pentru apariţia neoplaziilor a fost discutat.

10.10. **Pielea**

Într-un *carcinom spinocelular*, Makino şi colab. (147) au observat existenţa aneuploidiei. La pacienţii cu *carcinoame bazocelulare multiple*, Happle şi colab. (103, 104) au observat, în ţesutul tumoral, oberaţii cromozomiale nesistematizate (cromozomi markeri, fragmente acentrice, rupturi izocromatice, cromozomi dicentrici). Uneori, au apărut anomalii asemănătoare în culturile de fibroblaste derivate din pielea sănătoasă din jurul tumorilor şi în culturile de limfocite. Într-o singură tumoare au fost observate mai multe celule avînd anomalii identice, constituind o clonă caracterizată prin prezenţa unui cromozom adiţional în grupa E şi absenţa unui cromozom G.

Un număr mai mare de tumori au fost studiate cu *metode microspectrofotometrice*. Carcinoamele bazocelulare au un conţinut diploid de ADN sau prezintă o distribuţie bimodală, cu celule diploide şi tetraploide. Tumorile care pătrund adînc în corion tind să prezinte însă un conţinut heterogen de ADN (151). Carcinoamele spinocelulare au linii celulare hiperdiploide, triploide sau peritetraploide (67, 152).

In *dermatozele precanceroase* (keratoza senilă, leucoplazia vegetantă, boala Bowen, eritroplazia Queyrat) a fost observată o distribuţie largă a valorilor de ADN din celule, cuprinsă între tetraploidie şi octoploidie (66).

Au fost publicate date asupra constituţiei citogenetice a 40 de *melanoame maligne* (10, 35, 39, 53, 54, 82, 91, 110, 122, 175, 224, 252, 257). Majoritatea observaţiilor se referă la celulele metastatice din ganglionii limfatici sau din exsudate. Numerele modale sînt de obicei triploide, dar au fost observate variaţii largi, între hiperdiploidie şi tetraploidie. Existenţa cromozomilor markeri a fost de-

Scanned with OKEN Scanner

scrisă în mai multe publicaţii (10, 35, 39, 53, 54, 82, 91, 252, 257). Chen şi Shaw (53, 54), utilizînd tehnici de bandare, au reuşit să stabilească originea cromozomilor markeri din celulele unor linii de melanom menţinute *in vitro*. Numărul cazurilor este însă prea mic pentru a evidenţia eventuale modificări structurale comune.

10.11. **Alte tumori**

În 8 cazuri de *tumori osoase* giganto-celulare, Ishii (112) observă numere modale normale, diploide; seria de 6 sarcoame osoase prezenta aneuploidie.

Într-un *timom* malign, Kristoffersson (133) evidenţiază un număr modal de 46; unul din cromozomii grupei E lipsea, în timp ce în grupa C a fost observat un cromozom supranumerar. Într-un alt timom, probabil benign, au fost observate numai celule diploide (58).

Mezotelioamele sînt aneuploide şi prezintă diferiţi cromozomi markeri (31).

Într-o serie de 7 *sarcoame embrionare*, Nezeloff şi colab. (181) au observat prezenţa aneuploidiei, cu cromozomi suplimentari în grupele C, E şi F. În 5 cazuri a apărut un cromozom marker lung, cu centromerul distal. Într-un teratom sacro-coccigian benign, 6 metafaze au fost diploide, o celulă avea 47 de cromozomi (supranumerarul aparţinînd grupei D), iar o altă celulă avea 48 de cromozomi, cu doi cromozomi suplimentari în grupa E (137).

O serie mai mare, curinzînd 20 de tumori embrionare, a fost studiată de Rousseau (204), după o prealabilă cultivare *in vitro*. Numai 7 cazuri au prezentat aneuploidie, celelalte cazuri fiind diploide. Este însă posibil ca aceste rezultate să fi fost influenţate de condiţiile de cultură, care au putut determina selecţionarea elementelor stromale normale.

Într-un rabdomiosarcom embrionar metastatic, numărul modal a fost de 60; în toate metafazele a fost remarcată prezenţa unor corpusculi cromatinieni dubli (96).

Un sarcom nediferenţiat a prezentat un număr modal de 47 de cromozomi şi un cromozom marker lung (58). Un sarcom abdominal fibroblastic avea o linie susă hipodiploidă (42–43 de cromozomi) (179).

White şi Cox (253) au examinat două recidive succesive ale unui rabdomiosarcom, constatînd scăderea numărului modal de la 70 la 67–68 de cromozomi şi apariţia unor cromozomi markeri noi.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. ADAMS L. R., DAHLGREN S. E. — *Acta path. microbiol. scand.*, 1968, *72*, 561.
2. ARIAS-BERNAL L., JONES W. H. jr. — *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 1968, *100*, 785.
3. ATKIN N. B. — *Nature (Lond.)*, 1964, *202*, 201.
4. ATKIN N. B. — *Cancer*, 1964, *17*, 1 391.
5. ATKIN N. B. — *Europ. J. Cancer*, 1967, *3*, 289.
6. ATKIN N. B. — *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth.*, 1968, *75*, 211.
7. ATKIN N. B. — *Obstet. gynec. Surv.*, 1969, *24*, 794.
8. ATKIN N. B. — *Acta cytol.*, 1969, *13*, 270.
9. ATKIN N. B. — în: Genetic Concepts and Neoplasia, Ed. Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1970, p. 36.
10. ATKIN N. B. — *Brit. J. Cancer*, 1971, *25*, 487.
11. ATKIN N. B. — *Cancer*, 1971, *27*, 1 064.
12. ATKIN N. B. — *Brit. med. J.*, 1971, *i*, 271.
13. ATKIN N. B. — *Brit. J. Cancer*, 1973, *27*, 183.
14. ATKIN N. B. — *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaec.*, 1974, *14*, 39.
15. ATKIN N. B. — în: Chromosomes and cancer (sub red. J. German), Ed. John Wiley and Sons, New York-Londra-Toronto, 1974, p. 375.
16. ATKIN N. B., BAKER M. C. — *Acta cytol.*, 1964, *8*, 431.
17. ATKIN N. B., BAKER M. C. — *Brit. med. J.*, 1965, *i*, 522.
18. ATKIN N. B., BAKER M. C. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1966, *36*, 539.
19. ATKIN N. B., BAKER M. C. — *Lancet*, 1970, *i*, 470.
20. ATKIN N. B., BAKER M. C. — *Lancet*, 1974, *ii*, 599.
21. ATKIN N. B., BAKER M. C., WILSON S. — *Amer. J. Obstet. Gynec.* 1967, *99*, 506.
22. ATKIN N. B., BAKER M. C., ROBINSON R., GAZE S. E. — *Europ. J. Cancer*, 1974, *10*, 143.
23. ATKIN N. B., KLINGER H. P. — *Lancet*, 1961, *ii*, 727.
24. ATKIN N. B., MATTINSON H., BAKER M. C. — *Brit. J. Cancer*, 1966, *20*, 87.
25. ATKIN N. B., RICHARDS B. M. — *Brit. J. Cancer*, 1956, *10*, 769.
26. ATKIN N. B., RICHARDS B. M. — *Brit. med. J.*, 1962, *ii*, 1 445.
27. AUERSPERG N., COREY M. J., AUSTIN G. — *Lancet*, 1966, *i*, 604.
28. AUERSPERG N., COREY M. J., WORTH A. — *Cancer Res.*, 1967, *27*, 1 394.
29. AUERSPERG N., WAKONIG-VAARTAJA T. — *Acta cytol.*, 1970, *14*, 495.
30. AWANO I., TUDA F. — *Jap. J. Genet.*, 1959, *34*, 220.
31. AYRAUD N., KERMAREC J. — *Bull. Cancer*, 1968, *55*, 91.
32. BADER S., TAYLOR H. C. jr., ENGLE E. T. — *Lab. Invest.*, 1960, *9*, 443.
33. BAKER M. C. — *Brit. J. Cancer*, 1968, *22*, 683.
34. BAKER M. C., ATKIN N. B. — *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1970, *63*, 9.
35. BENEDICT W. F., BROWN C.D., PORTER I. H. — *N. Y. J. Med.*, 1971, *71*, 952.
36. BENEDICT W. F., PORTER I. H., BROWN C. D., FLORENTIN R. A. — *Lancet*, 1970, *i*, 971.
37. BENEDICT W. F., ROSEN W. C., BROWN C. D., PORTER I. H. — *Lancet*, 1969, *ii*, 640.
38. BERGER R., LACOUR J. — *Path. et Biol.*, 1974, *22*, 603.

Scanned with OKEN Scanner

11. STUDIUL NUCLEILOR INTERFAZICI ÎN TUMORILE MALIGNE

11.1. Introducere

Examenul cariotipurilor permite caracterizarea exactă a modificărilor cromozomiale din celulele maligne. Aplicarea tehnicilor cariologice nu este însă întotdeauna posibilă, deoarece calitatea metafazelor obținute din celulele tumorale este adesea insuficientă pentru a permite o cariotipare detaliată. În capitolele precedente am menționat însă unele proprietăți ale cromozomilor sexuali, care permit obținerea unor informații prețioase prin studiul nucleilor interfazici. Celulele diploide feminine conțin un cromozom X eucromatic, necondensat și activ și un cromozom X heterocromatic și inactiv. În decursul interfazei, cromozomul X inactivat alcătuiește *particula de cromatină sexuală (corpusculul Barr)*. Atunci cînd într-o celulă sînt prezenți mai mulți cromozomi X, numai unul este eucromatic și activ; ceilalți cromozomi X, supuși inactivării, devin vizibili în interfază sub forma particulelor de cromatină sexuală.

În urma colorării cu quinacrină și examinare în lumină ultravioletă, extremitatea distală a cromozomului Y prezintă, după cum am văzut, o fluorescență marcată, caracteristică. Cromozomul Y își menține fluorescența și în decursul interfazei, cînd poate fi evidențiat sub forma unei particule de cromatină intens fluorescentă, denumită *corpuscul Y (39)*. În condiții obișnuite, ceilalți cromozomi nu prezintă segmente fluorescente avînd dimensiuni și o intensitate comparabilă cu cea a cromozomului Y, ceea ce permite detectarea acestui cromozom.

11.2. Cromatina sexuală în tumorile maligne

În *tumorile mamare maligne* a fost constatată o incidență scăzută a cromatinei sexuale (20, 27, 29, 57). Pe baza conținutului în nuclei cromatino-pozitivi, tumorile au fost împărțite în mod arbitrar în două categorii: tumori de tip „masculin" (avînd 0–3% nuclei cromatino-pozitivi) și tumori de tip „feminin" (în care

Scanned with OKEN Scanner

incidența nucleilor pozitivi depășește 10% (fig. 51). Acestei clasificări i s-a atribuit o importanță prognostică și terapeutică. Astfel, s-a demonstrat existența unei corelații între incidența cromatinei sexuale și durata supraviețuirii. Atît în grupa tumorilor mamare fără

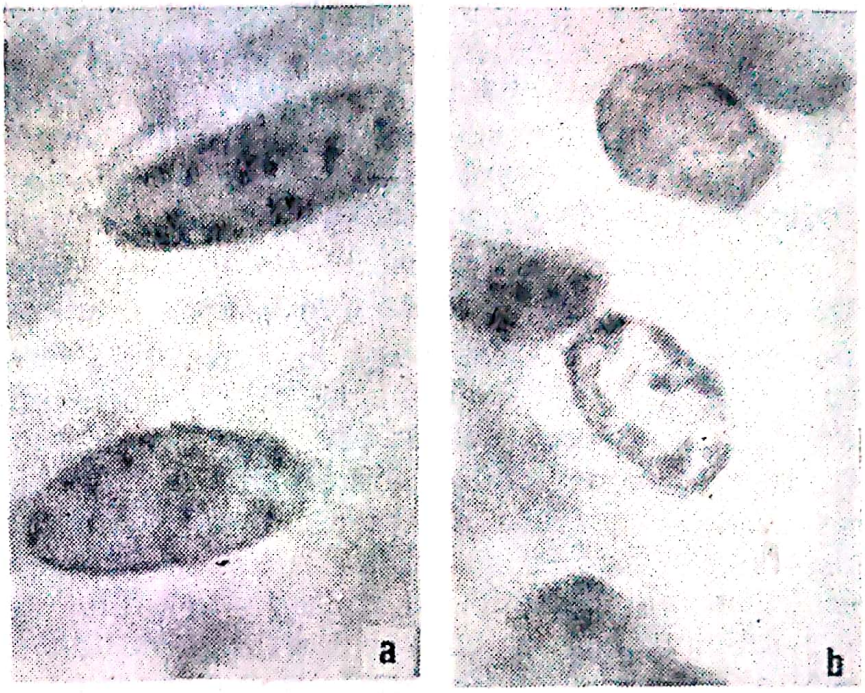


Fig. 51 — Celule dintr-o tumoare mamară cromatino-negativă (*a*) și cromatino-pozitivă (*b*).

metastaze, cît și în grupa tumorilor cu metastaze axilare (47, 56) sau osoase (46), cazurile sex-cromatino-negative au un prognostic mai grav decît cele sex-cromatino-pozitive (9). Făcîndu-se o legătură între supraviețuire și terapia aplicată, s-a sugerat că numai tumorile de tip „feminin" ar fi hormono-dependente, în timp ce tumorile de tip „masculin" nu ar fi influențate, sau ar fi influențate în sens defavorabil de terapia endocrină (17). Întrucît aceste afirmații ar putea avea implicații în terapia cancerului mamar, sînt necesare cîteva comentarii.

În primul rînd, distincția între tipul „feminin" și tipul „masculin" de tumoare nu este întotdeauna posibilă (14), clasificarea în aceste categorii necesitînd crearea unui hiatus artificial, deoarece există forme intermediare (10). Pe de altă parte, a fost observată o *corelație între incidența cromatinei sexuale și gradul de diferențiere citologică a tumorilor* (34, 51, 58). Tumorile diferențiate prezintă o frecvență înaltă a nucleilor cromatino-pozitivi, în timp ce în tumorile mai nediferențiate (caracterizate din punct de vedere citologic prin suprafețe de secțiune nucleară mai mari, valori crescute ale ADN din nuclei, indici mitotici mai ridicați și o activitate scăzută a unor enzime din ciclul acizilor tricarboxilici) crește procentul celulelor

Scanned with OKEN Scanner

cromatino-negative sau, mai rar, apar celule cu 2 sau chiar 3 particule de cromatină sexuală (1, 2, 12, 13, 18, 22–26, 32, 33, 36). Există de asemenea o corelație evidentă între incidența cromatinei sexuale și gradul de malignitate histologică a tumorilor, determinat pe baza criteriilor recomandate de U.I.C.C. (formare de canalicule, prezența hipercromaziei și a mitozelor, neregularitățile de talie, formă și colorabilitate a nucleilor). Tumorile cu un grad redus de malignitate au un conținut mai ridicat de celule cromatino-pozitive decît tumorile cu o malignitate mai exprimată (13). Toate aceste date demonstrează că evaluarea incidenței cromatinei sexuale în tumorile mamare are o importanță reală pentru stabilirea prognosticului pacientelor (13, 16).

În metastaze se constată valori ale cromatinei sexuale similare celor observate în tumorile primitive de origine (21, 55).

Mecanismele care stau la baza anomaliilor cromatinei sexuale în tumori nu sînt încă elucidate. Numărul particulelor de cromatină sexuală dintr-un nucleu este determinat, după cum am văzut, de numărul cromozomilor X heterocromatici și alociclici. În tumori, pierderea cromozomului X heterocromatic prin fenomene de nondisjuncție sau retardare anafazică ar duce la imposibilitatea de formare a cromatinei sexuale. Dublarea numărului de cromozomi X heterocromatici poate fi consecința unei nondisjuncții (situație în care, alături de celula care prezintă doi cromozomi X heterocromatici, se formează și o celulă complementară lipsită de cromozomul X heteropicnotic) sau a unei endoreduplicări selective a cromozomului X (3, 6). O altă posibilitate de duplicare a cromozomilor X ar putea fi reprezentată de dublarea întregii garnituri cromozomiale. Este greu de explicat în acest caz de ce numai o mică parte din celulele peritetraploide au două particule de cromatină sexuală, majoritatea lor fiind cromatino-negative. Se poate presupune că pierderea inițială a unor cromozomi (printre care și cromozomul X) ar antrena o dublare ulterioară a garniturii cromozomiale, cu realizarea unei hipotetraploidii (3).

Un mecanism diferit a fost propus de Straub și colab. (50). Autorii presupun că în unele celule tumorale avînd un set normal de cromozomi X s-ar produce o reversare a stării de condensare a unui cromozom X, cu realizarea unei situații asemănătoare cu cea din zigotul nou format, cînd ambii cromozomi X sînt activi.

Tumorile bărbaților sînt, în general, lipsite de particula de cromatină sexuală (3). În cazuri excepționale pot apărea însă tumori cromatino-pozitive și la bărbați, sugerînd prezența unor linii tumorale în care a avut loc duplicarea cromozomului X prin unul din mecanismele expuse (4).

Scanned with OKEN Scanner

Problema răspunsului la tratamentul cu hormoni androgeni este încă discutată. Shatz și Mardakhiasvili (45) presupun că absența cromatinei sexuale nu ar fi determinată de pierderea cromozomului X heteropicnotic, ci de un proces de despiralizare care ar avea drept consecință activarea genelor sale. În cazul glandei mamare normale sau al proceselor tumorale cromatino-pozitive, administrarea androgenilor ar anihila efectul stimulator al hormonilor estrogeni. În cazul tumorilor cromatino-negative, din cauza dezechilibrului genic condiționat de presupusa activare a genelor cromozomului X despiralizat, efectul de excludere a influenței estrogenilor nu s-ar mai produce, iar androgenii ar stimula creșterea tumorală datorită efectului lor propriu, anabolizant.

Numeroase statistici demonstrează însă că prognosticul pacientelor cu tumori cromatino-negative este mai grav decît al celor cu tumori cromatino-pozitive atît în cazurile tratate hormonal, cît și în cele netratate, el fiind condiționat de anaplazia crescută a acestor tumori (10, 24, 25, 33). Gropp și Wolf (19) conchid că nu este cazul să se renunțe la terapia endocrină, a cărei eficacitate a fost dovedită practic, deoarece existența unei coincidențe între absența cromatinei sexuale din celulele tumorale și lipsa de răspuns la tratamentul hormonal nu a fost demonstrată.

În cazurile de *carcinoame ale colului uterin* (15, 35, 48), ale *endometrului* (49) și ale *vulvei, vaginului* și *ovarelor* (54) s-a constatat o scădere a incidenței cromatinei sexuale, care a putut fi corelată cu gradul de diferențiere a tumorilor.

Aproximativ 90% din cazurile de *mole hidatiforme* sînt cromatino-pozitive. Se discută două explicații ale acestui fenomen neașteptat: fie că trofoblastul masculin (XY) este mai frecvent rejectat, fiind deosebit antigenic de organismul matern datorită genelor de histocompatibilitate localizate pe cromozomul Y; fie că trofoblastul feminin (XX) este mai susceptibil la transformarea neoplazică, poate și datorită unei produceri mai importante de hormoni gonadotrofici coriali și deci a ridicării nivelului de estrogeni materni (31, 38, 53).

Teratoamele prezintă de obicei o constituție cromozomială conformă cu cea a sexului pacientului (41, 42). Cazurile în care se observă abateri de la această regulă sînt explicate prin erori mitotice în celulele tumorale, care determină apariția unor clone celulare cu complemente anormale ale cromozomilor sexuali (52).

În *tumorile pulmonare* ale femeilor (8) și în *hipertrofiile și carcinoamele de prostată* (7) s-a observat o concordanță între sexul tumorii și cel al pacientului.

Scanned with OKEN Scanner

În *glioamele cerebrale* ale femeilor am constatat o scădere a incidenței cromatinei sexuale, care evoluează paralel cu gradul de malignitate histologică a tumorilor (37). Aceste date au fost confirmate recent de Zankl și colab. (59), care au demonstrat că substratul scăderii incidenței cromatinei sexuale este reprezentat de pierderea preferențială a unui cromozom X.

11.3. Corpusculul Y în tumorile maligne

Tehnica de fluorescență cu quinacrină pentru evidențierea cromozomilor Y în nucleii interfazici a fost aplicată inițial la studiul amprentelor de tumori și al celulelor tumorale izolate. Modificările ulterioare au făcut posibilă utilizarea acestei metode și în studiul secțiunilor histologice (28), permițîndu-se corelarea datelor citogenetice cu aspectul histopatologic al tumorilor. Primele cercetări au stabilit o corelație exactă între sexul pacientului și cel al tumorii, nucleii interfazici din cancerele bărbaților prezentînd unul sau mai mulți corpusculi Y fluorescenți, care lipsesc din cancerele femeilor (30). Investigațiile ulterioare au demonstrat însă că într-o mare parte din tumorile maligne ale bărbaților (18–21%), corpusculul Y fluorescent lipsește (5, 43, 44). Zankl și colab. (59) au confirmat absența cromozomului Y, sugerată de examenul nucleilor interfazici, prin examenul detaliat al cariotipurilor. Importanța pierderii cromozomului Y nu este cunoscută. În măduva osoasă a bolnavilor neleucemici a fost observată o pierdere considerabilă a cromozomilor Y, îndeosebi la persoanele în vîrstă (40). Bazați pe aceste date, Zankl și colab. (59) presupun că pierderea cromozomilor sexuali ar fi o consecință a proceselor biologice de senescență, mai pronunțate în celulele cu un indice mitotic ridicat (de exemplu, celulele medulare și celulele tumorale). Conform ipotezei emise de Sellyei și Vass (44), tumorile Y-negative ar fi rezultatul unor evenimente cromozomiale care au loc încă în etapa precanceroasă. Faptul că într-un polip au fost observate regiuni care prezentau doi corpusculi Y (5) sugerează de asemenea că apariția unor clone celulare anormale este posibilă încă în leziunile premaligne.

Semnificația prezenței unor corpusculi fluorescenți asemănători corpusculului Y în unele tumori ale femeilor este incertă (5, 30). Ei derivă probabil din regiunile fluorescente ale unor autozomi (regiunea centromerică a cromozomilor nr. 3, sateliții cromozomilor din

Scanned with OKEN Scanner

grupa D), care prezintă variații individuale considerabile și pot fi confundate în anumite situații cu corpusculul Y (11).

Studiul cromatinei sexuale și al corpusculului Y a demonstrat deci că în tumori există anomalii numerice ale cromozomilor sexuali. Cercetările care se desfășoară în prezent încearcă să stabilească momentul în care se produc aceste modificări, mecanismul producerii, precum și semnificația lor.

BIBLIOGRAFIE

1. ATKIN N. B. — *Cancer*, 1964, *17*, 1 391.
2. ATKIN N. B. — *Wien. klin. Wschr.*, 1964, *76*, 859.
3. ATKIN N. B. — *Brit. J. Cancer*, 1967, *21*, 40.
4. ATKIN N. B. — *Brit. J. Cancer*, 1971, *25*, 487.
5. ATKIN N. B. — *Brit. J. Cancer*, 1973, *27*, 183.
6. ATKIN N. B., PETKOVIC I. — *J. clin. Path.*, 1973, *26*, 126.
7. BARADNAY G., MONUS Z. — *Zschr. Urol.*, 1967, *60*, 571.
8. BARADNAY G., MONUS Z., KULKA F. — *Zbl. Allg. Path.*, 1968, *111*, 275.
9. BLÜMEL G., TURCIC G., REGELE H., VAGACS H.—*Wien. klin. Wschr.*, 1963, *75*, 41.
10. BOHLE A., BÜRGER E., FISCHBACH H., SCHÖLL A. — *Langembecks Arch. klin. Chir.*, 1965, *313*, 392.
11. CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C, și colab. — *Exp. Cell. Res.*, 1970, *61*, 472.
12. CHIRICUȚĂ I., OLINICI C. D. — *Viața med.*, 1970, *17*, 1 011.
13. CHIRICUȚĂ I., OLINICI C.D. — *Morphol. Embryol.*, 1975, *21*, 97.
14. FIERZ U., HEDINGER C. — *Klin. Wschr.*, 1969, *44*, 375.
15. FORNI A., MILES C. P. — *Acta cytol.*, 1966, *10*, 200.
16. GHOSH S. H., SHAH P. N. — *Acta cytol.*, 1975, *19*, 58.
17. GNATHYSHAK A. I., SLUZHINSKAYA Z. A. — *Vopr. Onkol.*, 1968, *14*, 3.
18. GROPP H., HEIN B., WOLF U. — *Zschr. Krebsforsch.*, 1966, *68*, 123.
19. GROPP H., WOLF U. — *Langenbecks Arch. klin. Chir.*, 1965, *313*, 400.
20. HIENZ H. A., EHLERS P. N. — *Klin. Wschr.*, 1957, *35*, 985.
21. HOCHBERG K., NURI M. — *Chirurg.*, 1966, *37*, 52.
22. KALLENBERGER A. — *Schweiz. med. Wschr.*, 1964, *94*, 1 450.
23. KALLENBERGER A. — *Praxis*, 1969, *58*, 536.
24. KALLENBERGER A., HAGMANN A., MEIER-RUGE W., DESCOUEDRES C. — *Schweiz. med. Wschr.*, 1967, *97*, 678.
25. KALLENBERGER A., HAGMANN A., DESCOUEDRES C. — *Europ. J. Cancer*, 1968, *3*, 439.
26. KALLENBERGER A., WENNER R. — *Schweiz. med. Wschr.*, 1966, *96*, 80.
27. KIMEL V. M. — *Cancer*, 1957, *10*, 922.
28. KOVACS M., VASS L., SELLYEI M. — *Stain Technol.*, 1973, *48*, 93.
29. LINDGREN I., ELOMAA E. — *Acta path. microbiol. scand.*, 1965, *64*, 50.
30. LITTON L. E., HOLLANDER D. H., BORGAONKAR D. S., FROST J. K. — *Acta cytol.*, 1972, *16*, 404.

Scanned with OKEN Scanner

12. HIBRIDAREA CELULARĂ

12.1. Introducere

Fenomenul de hibridare celulară somatică a fost descoperit în anul 1960 de către Barski şi colab. (2). Cultivînd împreună două linii de şoarece, linia N-1 şi linia N-2, autorii au observat că după o perioadă de trei luni de cultură mixtă apare un tip celular nou, caracterizat prin prezenţa unui număr de cromozomi corespunzător sumei celor două celule parentale şi prin prezenţa cromozomilor markeri derivaţi de la ambele specii (un acrocentric lung caracteristic liniei N-1 şi 12 metacentrici caracteristici liniei N-2). Cercetările lui Barski şi colab. (4–6) au fost în curînd confirmate de Sorieul şi Ephrussi (96), iar fenomenul de hibridare a deschis perspective noi biologiei în general şi oncologiei experimentale în special.

12.2. Procedee de obţinere a hibrizilor

Hibridarea celulară survine şi în mod *spontan*, prin cultivarea mixtă, în acelaşi vas de cultură, a unor celule somatice diferite. Frecvenţa fuziunilor celulare spontane este însă foarte joasă, ceea ce creează dificultăţi considerabile în izolarea clonelor hibride. În anul 1965, Davidson şi Ephrussi (22) au introdus un *procedeu de selecţie* bazat pe cercetările lui Littlefield (64, 65), care demonstrase că se poate stabili un sistem *in vitro* în care două linii celulare – deficiente în sinteza unor enzime diferite – nu pot supravieţui, în timp ce celulele hibride supravieţuiesc datorită complementării genetice reciproce. Utilizarea pe scară largă a hibrizilor celulari a devenit însă posibilă numai după ce Harris şi Watkins (47) au arătat că virusul Sendai inactivat, a cărui capacitate de a fuziona celulele tumorale în suspensie fusese descrisă de Okada (78), are şi proprietatea de a induce formarea de celule hibride *interspecifice*. În pri-

Scanned with OKEN Scanner

mele experienţe ale lui Harris şi Watkins (47) s-a reuşit fuzionarea celulelor de carcinom ascitic Ehrlich al şoarecelui cu celule HeLa, o linie celulară umană menţinută *in vitro*. Celulele hibride pot fi recunoscute pe baza caracterelor morfologice diferite ale nucleilor Ehrlich şi HeLa. O dovadă în plus pentru realitatea hibridării a fost adusă fuzionînd celule HeLa marcate cu timidină tritiată cu celule Ehrlich nemarcate. Celulele multinucleate formate conţineau atît nuclei marcaţi, cît şi nuclei nemarcaţi, rezultînd deci din fuziunea celulelor umane cu celule murine.

12.3. **Mecanismul fuziunii celulare**

Tratarea unei suspensii celulare cu virus Sendai determină aglomerarea celulelor, urmată de formarea unor punţi citoplasmatice fine între celulele adiacente, pentru ca în cele din urmă celulele să fuzioneze în întregime, rezultînd o celulă bi- sau multinucleată (45).

Utilizînd tehnici autoradiografice, Deaven şi Kreizinger (24) au observat celule multinucleate în care unii nuclei erau marcaţi iar alţii nu, sau celule în care ambii nuclei erau marcaţi, dar se aflau în stadii diferite ale sintezei de ADN. Aceasta demonstrează că fuziunea poate avea loc între celule aflate în stadii diferite ale ciclului celular. Atît în celulele multinucleate *homocariote* (rezultate din fuziunea unor celule identice), cît şi în celulele conţinînd tipuri diferite de nuclei *(heterocarioni)* se produce, de obicei, o sincronizare rapidă de ADN din nuclei (54). În unele cazuri persistă însă diferite grade de asincronie (52).

Un fenomen particular, denumit *condensare cromozomială prematură*, are loc atunci cînd o celulă aflată în interfază fuzionează cu o celulă în mitoză. Nucleul interfazic este forţat să intre prematur în mitoză, iar modificările care au loc în nucleii interfazici (condensarea cromatinei, dizolvarea membranei nucleare, dispariţia nucleolilor şi, în final, conturarea cromozomilor condensaţi prematur) sînt asemănătoare din multe puncte de vedere cu iniţierea profazei (49, 53, 83, 98).

Celulele multinucleate nu sînt stabile, iar reproducerea lor continuă este condiţionată de fuziunea nucleilor, care duce la formarea unui *sincarion* sau a unei *celule hibride proliferative*. Această fuziune are loc prin intrarea simultană în mitoză a nucleilor. În decursul metafazei se formează un singur fus mitotic, iar în placa ecuatorială se dispun toţi cromozomii. Celulele fiice care iau naştere conţin cromozomi proveniţi de la ambele celule implicate în

Scanned with OKEN Scanner

fuziune (45). Ciclul celular al celulelor hibride, la început anormal de lung, se normalizează după cîteva diviziuni (42). În celulele hibride se păstrează însă ordinea replicării cromozomilor din celulele parentale (94), ceea ce dovedește că mecanismele care controlează secvențializarea replicării cromozomilor dintr-un genom nu sînt afectate de prezența altui genom în același nucleu.

12.4. **Generalitatea fenomenului de hibridare**

Primele cercetări asupra hibridării au implicat fuzionarea unor celule maligne între ele. Ulterior, s-a reușit hibridarea celulelor maligne cu parteneri diploizi sau a unor celule diploide între ele (34). Recent, celule somatice cultivate *in vitro* au putut fi fuzionate cu spermatide (77) sau spermatozoizi (86).

Speciile implicate în hibridare sînt extrem de variate, reușindu-se hibridarea între mamifere foarte îndepărtate din punct de vedere sistematic (șoarece×om, hamster auriu×om, hamster chinez×șoarece etc.), precum și între mamifere (hamsterul auriu) și poikiloterme (broasca țestoasă).

12.5. **Constituția citogenetică a celulelor hibride. Aplicații la studiul geneticii umane**

Celulele hibride conțin inițial cîte un set de cromozomi de la fiecare celulă parentală. Ulterior, în decursul pasajelor repetate *in vitro*, celulele hibride pierd anumiți cromozomi. În cazul hibridărilor intraspecifice, această pierdere este lentă și limitată, iar după ce hibrizii pierd 10–20% din totalul cromozomilor, cariotipul se stabilizează. Hibrizii interspecifici pierd însă în mod preferențial cromozomii proveniți de la una din speciile parentale implicate în fuziune (74, 76, 81). Hibrizii de șoarece×om (112) și hamster chinez×om (57) pierd în mod preferențial cromozomii umani. Mecanismul exact al pierderii cromozomilor umani nu este cunoscut, dar el pare a fi reprezentat de atașarea mai puțin eficientă a acestor cromozomi de fibrele fusului în decursul mitozei.

Ca rezultat al eliminării cromozomilor umani, se pot izola clone în care unul sau mai mulți cromozomi de om se suprapun pe un genom intact de șoarece. Utilizarea noilor tehnici de bandare a

Scanned with OKEN Scanner

cromozomilor a făcut posibilă recunoaşterea exactă a originii de specie a cromozomilor din celulele hibride (1). Înregistrarea cromozomilor umani din clonele hibride şi corelarea lor cu markerii enzimatici permit localizarea genelor pe cromozomi. Prezenţa sau absenţa concomitentă a unui cromozom uman şi a unei anumite enzime umane demonstrează localizarea genei care guvernează sinteza respectivei enzime pe un cromozom specific (85). Segregarea concordantă a unor enzime diferite dovedeşte faptul că genele responsabile de sinteza lor sînt situate pe acelaşi cromozom, indiferent de distanţa care le separă (sintenie).

Prin combinarea studiilor familiale cu rezultatele cercetărilor de hibridare celulară s-a reuşit cartografierea parţială a cromozomilor umani (9, 11, 13–18, 28, 30, 35–38, 55, 66, 68, 69, 71, 80, 82, 85, 90, 91, 93, 99–104, 106, 110, 113, 114). Se deschid, astfel, perspectivele alcătuirii unor hărţi genetice pentru cromozomii umani, comparabile cu cele existente la eucariotele inferioare (92).

12.6. **Aportul hibridării celulare la studiul diferenţierii**

Diferenţierea celulară – procesul prin care descendenţii unei celule parentale comune dobîndesc o anumită specializare morfofuncţională (109) – interesează în egală măsură pe embriologi şi pe oncologi. Ca rezultat al diferenţierii celulare, produsele activităţii genice variază atît în diferitele tipuri de celule, cît şi în cadrul unui anumit tip celular, în funcţie de stadiile succesive ale diferenţierii. Diferenţierea celulară nu este un proces ireversibil, iar celule înalt diferenţiate (macrofagele, eritrocitele de găină, neuronii din creierul adult) pot relua funcţii stinse ca urmare a specializării lor restrînse (de exemplu, sinteza de ADN şi ARN) prin hibridare cu celule mai puţin diferenţiate (40, 44, 45, 48, 50).

Hibrizii rezultaţi din fuzionarea unor celule care diferă în ceea ce priveşte *genele structurale* realizează, de obicei, sintezele enzimatice caracteristice ambilor parentali (29, 34, 56, 75). Celulele parentale care prezintă, ca urmare a unor mutaţii, diferenţe în sinteza unor enzime diferite se complementează reciproc, suplinindu-şi deficienţele. Rezultatele cercetărilor referitoare la intervenţia *genelor reglatoare* sînt mai dificil de interpretat. Cu puţine excepţii, consecinţa hibridării unei celule capabile să realizeze funcţii extrem de diferenţiate (de exemplu, producerea de melanină de către celulele melanoamelor, secreţia hormonului de creştere de către tumorile hipofizare, secreţia enzimelor hepatice de către celulele hepatoame-

Scanned with OKEN Scanner

lor) cu o celulă nediferențiată este represia, cel puțin temporară, a caracteristicilor partenerului diferențiat (19, 21, 23, 29, 51, 67, 84, 88, 89, 95, 111, 115). Întrucît majoritatea hibrizilor conțineau un număr de cromozomi corespunzător sumei complementelor cromozomiale parentale, pare puțin probabil ca stingerea funcțiilor diferențiate să fie consecința pierderii cromozomilor purtători ai genelor structurale răspunzătoare de sintezele respective. Dealtfel, funcțiile supresate se pot reexprima în unele celule hibride care au pierdut cromozomi (58, 111, 115). Aceasta dovedește că menținerea extincției unei funcții diferențiate este condiționată de prezența anumitor cromozomi (29). S-a sugerat că extincția funcțiilor diferențiate din hibrizi ar fi indusă de o substanță reglatoare difuzabilă, cu acțiune negativă, asemănătoare represorului de tip bacterian, sintetizată de celula nediferențiată (23).

12.7. **Aplicații ale hibridării celulare la studiul cancerului**

12.7.1. Malignitatea celulelor hibride

Examinînd proprietățile celulelor hibride apărute spontan, prin cultivarea în cultură mixtă a două linii celulare de șoarece, una foarte malignă (N–1) și alta mai puțin malignă (N–2), Barski și colab. (4–6) au constatat că celulele hibride aveau o capacitate tumorigenă similară cu cea a partenerului mai malign. Hibrizii dintre o linie permanentă de celule de șoarece (2 472-6 derivată din linia N–1) și celule diploide de șoarece au moștenit proprietățile caracteristice liniei maligne (lipsa inhibiției de contact, capacitate de creștere rapidă și continuă) (87). De asemenea, hibrizii care au luat naștere spontan în culturi mixte de celule nemaligne de șoarece și celule de șoarece transformate cu virus polyoma au un comportament malign (25, 26). Pe baza acestor date s-a tras concluzia că în celulele hibride malignitatea se comportă ca un *caracter dominant.*

Rezultatele publicate de Silagi (89) sînt însă mai puțin concludente. Studiind comportamentul hibrizilor dintre celulele unui melanom malign și celule din linia fibroblastică A9 (care are o malignitate extrem de joasă), autoarea a constatat că unele clone aveau o malignitate ridicată, inducînd tumori la majoritatea animalelor, în timp ce alte clone aveau o malignitate redusă, inducînd puține tumori.

Scanned with OKEN Scanner

În toate aceste experienţe, malignitatea celulelor hibride a fost testată prin injectare la animale. Procedeul oferă însă posibilitatea ca din populaţia heterogenă de celule hibride să se selecţioneze un număr limitat de celule maligne, care să răspundă de apariţia tumorilor. Această eventualitate nu a fost examinată în publicaţiile menţionate, care nu au comparat constituţia citogenică a celulelor hibride injectate cu cea a tumorilor rezultate.

Recent, Klein şi colab. (59) au hibridat celule ascitice Ehrlich, SEWA (sarcom ascitic indus prin injectarea virusului polyoma la un şoarece nou-născut din linia A.SW), MSWBS (sarcom ascitic derivat dintr-o tumoare indusă prin injectare de metilcolantren la un şoarece hibrid A.SW×A), YAC şi YACIR (două sublinii ale unui limfom indus cu virus Moloney la şoareci din linia A/Su) cu celule A9, B82 şi A9R (derivate din linia L). Toate tumorile experimentale studiate au o malignitate ridicată, în timp ce celulele derivate din linia L au o capacitate foarte limitată de creştere progresivă *in vivo* şi dau arareori naştere la tumori, chiar dacă sînt inoculate în număr mare. În toţi hibrizii testaţi, caracterul foarte malign al celulelor tumorale a fost supresat prin fuziunea cu derivaţii liniei L. Fenomenul de supresie, manifestat prin incapacitatea de a induce tumori în urma inoculării la animale, s-a menţinut atît timp cît celulele hibride au păstrat seturile cromozomiale complete ale celor doi parentali.

În cazurile în care injectarea celulelor hibride a determinat totuşi apariţia de tumori, s-a constatat o reducere masivă a numărului de cromozomi din celulele tumorale în comparaţie cu celulele hibride injectate. Aceasta arată că tumorile apărute sînt rezultatul proliferării acelei fracţiuni de celule hibride care au pierdut cromozomi.

Rezultatele obţinute prin hibridarea celulelor ascitice Ehrlich cu fibroblaste diploide normale sînt în aparenţă mai puţin concludente, deoarece malignitatea carcinomului Ehrlich nu a fost supresată, incidenţa tumorilor induse fiind destul de mare. În acest caz, însă, celulele hibride au manifestat o instabilitate deosebită, astfel că în momentul injectării ele prezentau deja o reducere marcată a numărului de cromozomi, sub cifra care era de aşteptat în urma fuziunii parentale (12). Hibridîndu-se însă celule SEWA şi TA3 cu fibroblaste diploide, s-a demonstrat că şi fibroblastele normale pot supresa malignitatea (119), dar numai atunci cînd în celulele hibride sînt reţinute seturile cromozomiale complete ale celor două celule parentale.

Conform acestor cercetări, malignitatea se comportă ca un *caracter recesiv*, ea fiind rezultatul unor pierderi genetice. Admiţînd ideea că malignitatea este rezultatul unei deleţii genetice sau al unei mutaţii genice care determină sinteza unui produs nefuncţional, supre-

Scanned with OKEN Scanner

sia malignității în urma fuziunii cu un partener normal poate fi explicată prin capacitatea acestuia de a complementa defectul.

Fuziunea a două linii celulare maligne nu duce însă la supresia malignității. Astfel, malignitatea celulelor A9HT, o variantă malignă a liniei A9 (120), este supresată prin fuziune cu limfocite diploide normale, dar nu și cu celulele limfomului malign peridiploid YACIR (121). Conform modelului expus, limfocitele normale ar poseda componenta „complementară", în timp ce celulele limfomului malign au pierdut-o. Extinzînd cercetările lor asupra unui număr mare de hibrizi rezultați din fuziunea a două linii celulare maligne (SEWA/A9HT, SEWA/TA3HaB, MSWBS/Ta3Ha, MSWBS/EL4, MSWBS/YACIR, MSWBS/YAC, MBA/YACIR, YACIR/A9HT, Ehrlich/A9HT, TA3Ha/A9HT, TA3HaB/EL4), Wiener și colab. (122) au arătat că, exceptînd hibrizii MSWBS/YACIR, fuziunea a două celule maligne a dat naștere unor hibrizi cu malignitate înaltă. Faptul că liniile celulare maligne nu se complementează între ele ridică posibilitatea extrem de interesantă ca malignitatea să fie determinată de leziuni recesive în același locus. Alte interpretări nu sînt însă excluse. Este astfel posibil ca malignitatea să nu fie determinată de evenimente mutaționale, ci de deranjamente epigenetice sau ca genele, capabile să se complementeze între ele, să nu realizeze complementarea fiind menținute într-o stare inactivă prin mecanisme epigenetice stabile, asemănătoare acelora care determină diferențierea sau condiționează inactivarea unuia din cromozomii X ai femeii.

Excepțiile de la modelul malignității ca o consecință a pierderii de cromozomi sînt puțin numeroase. Murayama-Okabayshi și colab. (73), care au fuzionat celule Ehrlich cu celule L, au constatat că hibrizii care pierduseră un număr apreciabil de cromozomi prezentau o *malignitate intermediară* între cei doi parentali. Aceste rezultate nu invalidează ipoteza malignității ca un rezultat al pierderii de cromozomi, dar îi conferă o mai mare complexitate, demonstrînd că regula „totului sau nimic" nu este întotdeauna aplicabilă. Situațiile în care celulele hibride prezentau caracteristicile partenerului mai malign, deși numărul lor total de cromozomi corespundea sumei cromozomilor din celulele parentale (7, 8), sînt mai dificil de interpretat. Întrucît aceste cercetări au fost efectuate cu ajutorul tehnicilor clasice de colorație, care nu permit identificarea exactă a tuturor cromozomilor din celulele hibride, este posibil să se fi pierdut un anumit cromozom specific, deși numărul global de cromozomi nu era afectat.

Rezultate extrem de interesante au fost obținute prin fuzionarea liniei diploide umane B46M, derivată dintr-un limfom Burkitt, cu celule din linia aneuploidă de șoarece Cl–1–D (123). Inocularea

Scanned with OKEN Scanner

celulelor B46M pe șoareci cortizonați induce formarea de tumori, în timp ce celulele Cl–1–D nu sînt tumorigene. Clonele hibride, care reținuseră 15–20 de cromozomi umani (identificați cu ajutorul tehnicii de bandare cu quinacrină), prezentau o capacitate tumorigenă mai redusă decît a liniei B46M, manifestată printr-o incidență mai mică a tumorilor apărute în urma heterotransplantării pe șoareci. În decursul evoluției, incidența tumorilor a scăzut progresiv, iar nodulii tumorali apăruți regresau. Reducerea capacității tumorigene a evoluat paralel cu o scădere masivă a numărului de cromozomi umani din celulele hibride. Această experiență ridică posibilitatea ca un anumit cromozom dintr-o celulă umană să aibă capacitatea de a conferi unei celule nemaligne proprietatea de a crește progresiv pe un organism compatibil (72).

12.7.2. Antigenele de histocompatibilitate în celulele hibride

Primele cercetări referitoare la expresia antigenelor de histocompatibilitate au fost efectuate asupra hibrizilor formați spontan între linii de șoarece diferite în ceea ce privește antigenele determinate de locusul H–2. Spencer și colab. (97) au dovedit că în celulele hibride erau exprimate antigenele de histocompatibilitate ale ambilor parentali. În cazul hibrizilor interspecifici s-a demonstrat că intermixtiunea antigenelor de suprafață survine curînd după formarea heterocarionilor (3, 33, 46, 108), iar rezultatele lui Van der Noordaa (105) sugerează că este posibilă coexistența proprietăților de suprafață normale și transformate. Pe baza acestor date s-a conchis că expresia antigenelor de suprafață este *codominantă*.

Există două *excepții* de la această regulă, ceea ce arată că determinismul antigenelor este mai complex decît se credea. Astfel, în hibrizii rezultați din fuzionarea celulelor Ehrlich cu celule din liniile A9, B82 și A9RI (derivate din linia L), celulele Ehrlich supresau antigenele contribuite de ceilalți parentali. Supresia antigenică exercitată de celulele Ehrlich interesează antigenele de histocompatibilitate determinate genetic (H–2), antigenele induse (antigenul de suprafață de tip FMR), precum și sistemul antigenic L, caracteristic liniei L și subliniilor derivate din ea. Supresia antigenică pare a fi determinată de mecanisme care operează la nivelul membranei celulare și nu este consecința pierderii cromozomilor care poartă locii genetici responsabili de sinteza antigenelor respective (62). Dealtfel,

Scanned with OKEN Scanner

in unii segreganți maligni derivați din populația celulară hibridă în urma pierderii de cromozomi, antigenele supresate pot reapărea, în timp ce în alții, ele rămîn supresate (43). Aceste rezultate arată că malignitatea nu este ligaturată cu expresia sau supresia antigenelor H–2 sau a antigenelor de suprafață induse viral (cu alte cuvinte, genele care determină malignitatea și cele care determină expresia antigenelor sînt localizate pe cromozomi diferiți).

Un al doilea exemplu de supresie antigenică este acela a două sublinii ale tumorii TA3, un adenocarcinom mamar apărut la linia de șoareci A. Sublinia TA3/Ha (Hauschka) are o expresie joasă a antigenelor H–2 și este capabilă să crească pe șoareci alogenici, indiferent de linie. Sublinia TA3/St (Stockholm) are o expresie înaltă a antigenelor H–2, iar creșterea sa este limitată la linia A. Hibridarea celulelor TA3/Ha cu fibroblaști normali ACA nu este urmată de supresia antigenului H-2 derivat din linia ACA, ci dimpotrivă, celulele TA3/Ha recapătă nivelul antigenic H–2 înalt, caracteristic pentru linia TA3/St. Se pare că în linia TA3/Ha este deficitară o etapă în sinteza antigenului sau în încorporarea sa în membrana celulară (60), care este complementată prin fuziune cu fibroblaste normale.

Prin fuzionarea unor celule transformate de virusul polyoma cu celule SEWA (63) sau cu celule dintr-o linie fibroblastică (70) au fost obținute clone celulare cu o malignitate redusă, dar care continuau să producă antigenul de transplantare indus de virusul polyoma. Întrucît prezența antigenului polyoma reflectă menținerea genomului viral (sau, cel puțin, a unei părți din el) în celulele hibride, înseamnă că introducerea genomului viral într-o celulă normală nu este suficientă pentru realizarea potențialului malign. Se pare că virusurile nu intervin direct în procesul de transformare a celulelor. Mecanismele indirecte prin care s-ar putea realiza transformarea indusă viral includ interferența cu mecanismele normale de reglare celulară și acțiunea asupra cromozomilor, cu realizarea unei stări de instabilitate genetică (72).

Recent, Watkins și Chen (107) au hibridat celule Ehrlich cu fibroblaști de hamster transformați sub acțiunea virusului polyoma. Injectarea șoarecilor cu celule hibride era urmată de rejectarea implantului, iar șoarecii deveneau rezistenți la reinocularea ulterioară de celule Ehrlich. Acest fenomen deschide perspective interesante pentru imunoterapie, prin posibilitatea de utilizare a unor variante celulare antigenice, dar cu o malignitate atenuată.

Scanned with OKEN Scanner

12.7.3. Rolul hibridării celulare în oncogeneză

Există foarte puține date referitoare la intervenția hibridării celulare în *inițierea proliferării neoplazice*. Experiențele lui Elkort și colab. (27) sînt însă foarte sugestive în acest sens. Autorii au tratat celulele unei linii de hamster cu virus Sendai inactivat. Injectarea celulelor fuzionate în punga jugală a hamsterilor a determinat apariția de tumori, în timp ce celulele netratate din aceeași linie erau netumorigene. Pornind de la aceste date, Miller (72) presupune că prima etapă în istoria naturală a cancerelor ar putea-o constitui hibridarea între celulele normale ale gazdei. Celulele tetraploide rezultate din fuziune ar deveni apoi aneuploide, ca urmare a pierderii de cromozomi determinată de erorile mitotice. Analogia cu evoluția citogenetică a celulelor transformate *in vitro* și a unor tumori este evidentă.

Tehnicile de hibridare celulară au adus dovezi referitoare la determinismul cromozomial al *diferențierii tumorilor*. Finch și Ephrussi (32) au hibridat celulele unui teratom multipotent de șoarece cu celule din clona 1D sau cu celule dintr-o sublinie N-1. Prin inocularea celulelor hibride rezultau tumori nediferențiate, în timp ce celulele teratomului de șoarece induc tumori formate din țesut neural, cartilaj, os și mezenchim. În acest caz, partenerul nediferențiat și-a impus caracteristicile asupra partenerului diferențiat.

Wiener și colab. (115) au obținut o linie celulară hibridă prin fuzionarea unor celule L, avînd o morfologie fibroblastică, cu celule limfocitare derivate dintr-un limfom indus cu virus Moloney. Celulele hibride, care aveau o constituție cromozomială corespunzătoare sumei seturilor de cromozomi ale celor doi parentali, induceau tumori cu aspect fibroblastic. Ocazional au apărut însă și tumori cu o morfologie limfocitară; în aceste tumori s-a observat însă o reducere drastică a numărului de cromozomi. Rezultatele acestor experiențe arată că determinanții morfologiei limfocitare nu sînt pierduți din celulele hibride și că se pot reexprima atunci cînd determinanții morfologiei fibroblastice sînt eliminați.

Hibridarea dintre celulele tumorale și celulele gazdei ar putea juca un rol important în *progresiunea tumorilor*. Wiener și colab. (31, 117, 118) au arătat că tumorile injectate șoarecilor din linia CBA hibridează cu celulele gazdei. Hibridarea a fost demonstrată prin evidențierea în aceeași metafază a cromozomilor markeri caracteristici liniei tumorale injectate și a cromozomlior markeri T6, proprii liniei CBA. Toate celulele maligne rezultate în urma fuziunii au prezentat un nivel înalt al tumorigenicității.

Scanned with OKEN Scanner

Cu ajutorul noilor tehnici de bandare a cromozomilor, Goldenberg și colab. (39) au demonstrat că tumoarea rezultată din implantarea unui gliom astrocitar uman în punga jugală a hamsterului avea o natură hibridă, celulele sale conținînd atît cromozomi de om, cît și cromozomi de hamster. Această tumoare, transplantabilă în serie pe hamster, crește invaziv și formează metastaze. Dimpotrivă, în tumorile rezultate din inocularea unui carcinom cervical uman la șoareci (10) și din inocularea celulelor Ehrlich la șobolani (79) nu au fost observate celule hibride. În aceste ultime două sisteme, tumorile au regresat și au fost în cele din urmă rejectate, ceea ce sugerează că hibridarea celulară poate juca un rol decisiv în „naturalizarea" tumorilor heterografate.

Este posibil ca celulele hibride, datorită informației genetice suplimentare pe care o conțin ca urmare a poliploidiei, să poată suporta pierderi cromozomiale care ar fi letale pentru celulele diploide. Variantele antigenice rezultate în urma acestor pierderi cromozomiale (20, 61, 116) ar putea depăși mai ușor barierele de apărare ale gazdei. Un mecanism similar ar putea opera și în tumorile spontane, dar evidențierea sa este dificilă din cauza imposibilității de a deosebi cromozomii celulelor tumorale de cei derivați din celulele normale ale gazdei, implicate eventual în fuziune.

Aplicarea tehnicilor de hibridare celulară a permis astfel evidențierea rolului central al modificărilor cromozomiale în procesul de carcinogeneză, indiferent de natura virusală sau chimică a agentului declanșator. După Miller (72), „este greu de imaginat în momentul de față o altă metodă care să poată contribui atît de mult la înțelegerea interdependenței dintre factorii exogeni și endogeni în etiologia și progresiunea bolii neoplazice".

BIBLIOGRAFIE

1. ALLERDICE P. W., MILLER O. J., PEARSON P. L. și colab. — *J. Cell Sci.*, 1973, *12* 809.
2. BARSKI G. — *Nature (Lond.)*, 1970, *227*, 17.
3. BARSKI G., BLANCHARD M. G., YOUN J. K., LEON B. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1973, *51*, 781.
4. BARSKI G., CORNEFERT F., — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1962, *28*, 801.
5. BARSKI G., SORIEUL S., CORNEFERT F. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1960, *251*, 1 825
6. BARSKI G., SORIEUL S., CORNEFERT F. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1961, *26*, 1 269.
7. BEREBBI M., BARSKI G. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1971, *272*, 351.
8. BEREBBI M., LEPOINT P., FONDARAI J., MEYER G. — *Cytogenet. Cell Genet.*, 1973 *12*, 215.
9. BERG K., BEARN A. G. — *J. exp. Med.*, 1966, *123*, 379.
10. BORDELON M. R., STUBBLEFIELD E. — *Nature (Lond.)*, 1974, *252*, 324.

Scanned with OKEN Scanner

13. CROMOZOMII ȘI CARCINOGENEZA CHIMICĂ

13.1. Introducere

Prima observație asupra rolului agenților chimici în carcinogeneză a fost făcută de chirurgul englez Percivall Pott, care în anul 1775 a atras atenția asupra frecvenței mari a cancerelor scrotale la hornari, ca urmare a contactului cu funinginea. Confirmarea experimentală a observațiilor lui Pott a fost efectuată de Yamagiwa și Ichikawa (79), care au arătat că pensularea urechii iepurilor cu gudron de cărbune duce la apariția cancerelor cutanate. Ulterior, numeroase substanțe chimice s-au dovedit a fi cancerigene la șoareci, șobolani și hamsteri. Multe dintre ele, acționînd asupra omului în cantități mici, dar de-a lungul întregii vieți, ar putea juca un rol important în etiologia cancerelor. Dealtfel, patologia geografică și profesională a sugerat că numeroase cancere umane sînt consecința acțiunii factorilor de mediu.

Principalele probleme care se ridică în legătură cu mecanismele de acțiune ale agenților cancerigeni pot fi rezumate astfel (14):

a) Agenții chimici *induc* transformarea malignă sau *selectează* numai o populație celulară tumorală preexistentă?

b) Dacă, cancerizarea este datorită inducției, este ea consecința unui *efect direct* al agentului chimic asupra unei ținte specifice din celulă (ADN, ARN, proteine) sau a unui *efect indirect*, cum ar fi activarea unui virus latent?

Încercările de a răspunde la aceste întrebări s-au concretizat în mai multe ipoteze, care nu fac decît să reflecte incertitudinile existente în acest domeniu. Această situație a fost ilustrată de Miller (48) în schema din fig. 52.

Unul din modelele experimentale utilizate pentru clarificarea mecanismelor celulare și moleculare ale carcinogenezei chimice este reprezentat de *carcinogeneza in vitro* (8, 9, 18–22, 26). S-a demonstrat că tratarea unor culturi de celule cu agenți cancerigeni determină apariția unor modificări morfologice și biologice cunoscute sub numele de transformare. Injectarea celulelor transformate la ani-

Scanned with OKEN Scanner

male duce la apariţia unor tumori similare cu cele care se obţin prin injectarea directă a agentului chimic.

Studiul carcinogenezei *in vitro* a adus cîteva argumente importante în favoarea ipotezei inducţiei: a) transformarea neoplazică nu

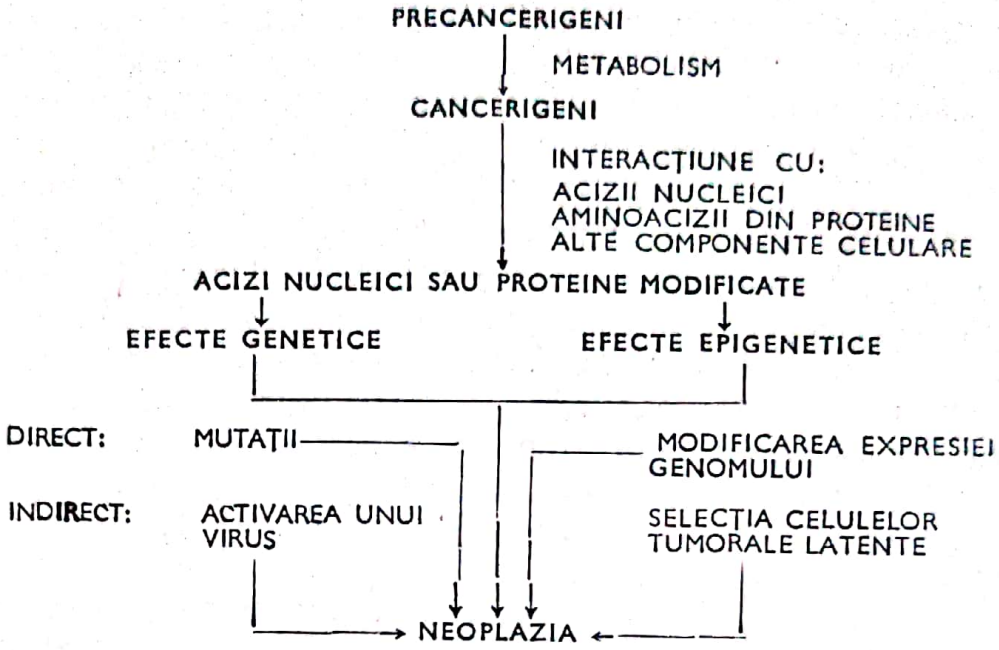


Fig. 52 — Mecanismele posibile ale carcinogenezei chimice (modificat după Miller, 48)

are loc în absenţa agenţilor cancerigeni; b) există o corelaţie între activitatea cancerigenă *in vivo* şi numărul de celule transformate *in vitro;* c) tratarea cu metilcolantren a celulelor individuale, izolate din prostata de şoarece, determină apariţia coloniilor transformate în 100% din clone (53). Eficienţa mare a transformării în culturile derivate din celule izolate exclude posibilitatea ca agenţii chimici să acţioneze prin selectarea unei populaţii celulare neoplazice preexistente.

Se pare că agenţii cancerigeni chimici induc transformarea în mod direct, interacţionînd cu anumite componente celulare, şi nu prin activarea unui virus latent. Toate încercările de a detecta prezenţa unor virusuri sau a „urmelor" lor s-au soldat cu rezultate negative. Pe de altă parte, tumorile induse prin injectarea hidrocarburilor cancerigene (metilcolantren, dimetilbenzantracen) la rozătoare prezintă antigene de transplantare specifice tumorale individuale, distincte pentru fiecare tumoare. Acest fenomen nu este datorit unor deosebiri genetice între animale, deoarece inocularea agentului cancerigen în mai multe locuri pe acelaşi animal determină apariţia unor tumori deosebite antigenic. Tratarea *in vitro* cu metilcolantren

Scanned with OKEN Scanner

a celulelor fibroblastice izolate din prostata de şoarece induce apariţia unor linii celulare transformate care posedă, de asemenea, antigene specifice individuale. Dimpotrivă, antigenele tumorilor induse de un anumit virus oncogen sînt similare între ele, dar nu reacţionează încrucişat cu antigenele tumorilor induse de alte virusuri, diferite antigenic. Aceste studii arată că transformarea chimică este rezultatul direct al interacţiunii dintre agentul chimic şi celulă (14) şi nu consecinţa activării unui virus. Faptul că antigenele de transplantare ale tumorilor induse chimic sînt diferite, sugerează că acţiunea agenţilor chimici asupra celulelor nu este identică, fiecare tumoare fiind consecinţa unor evenimente specifice.

Admiţînd că malignizarea este rezultatul interacţiunii agentului cancerigen cu celula şi că ea nu necesită intervenţia unui virus oncogen, se ridică următoarea întrebare: care componentă celulară reprezintă ţinta agentului cancerigen? În prezent există două răspunsuri posibile: a) substanţele chimice cancerigene acţionează asupra ADN, determinînd o modificare a informaţiei conţinute în această macromoleculă (mutaţie); b) agenţii cancerigeni determină alteraţii ale unor proteine specifice sau ale ARN, avînd drept consecinţă o modificare relativ stabilă şi ereditară a expresiei genomului. Conform primei ipoteze, cancerul este o boală genetică; conform celei de a doua, mecanismul său este epigenetic.

a) *Ipoteza mutaţiei genetice.* Celulele tumorale se deosebesc de celulele normale printr-o serie de trăsături fenotipice, dintre care cele mai importante sînt: pierderea controlului multiplicării celulare, invazivitate şi capacitate de metastazare, pierderea funcţiilor specializate, pierderea sau apariţia unor antigene specifice, glicoliza anaerobă crescută, modificarea profilului enzimatic (28). Caracterul ereditar al acestor proprietăţi, care se transmit celulelor-fiice, poate fi explicat cel mai simplu admiţînd că neoplazia este o boală genetică. Termenul de boală genetică este definit printr-o alterare cantitativă sau calitativă a informaţiei conţinute în genele cromozomiale. Această definiţie include atît modificarea secvenţei normale a bazelor din anumite gene, cît şi pierderea unor gene, a unor părţi de cromozomi sau a unor cromozomi întregi sau un exces de gene normale, aşa cum se întîmplă în celulele aneuploide sau poliploide (64). Ipoteza mutaţiei genetice este susţinută de următoarele categorii de argumente:

– Prezenţa unor modificări cromozomiale vizibile în majoritatea cancerelor umane şi a tumorilor induse experimental.

– Majoritatea cancerigenilor chimici, dintre care mulţi nu au capacitatea de a reacţiona cu macromoleculele (ADN, ARN sau pro-

Scanned with OKEN Scanner

teine) trebuie să fie convertiţi în cancerigeni „finali", cu o reactivitate chimică înaltă, înainte de a-şi exercita efectul oncogen (66).

S-a demonstrat că mulţi agenţi cancerigeni au proprietatea de a reacţiona cu ADN fie direct, fie după o prealabilă metabolizare *in vivo*. Pe baza modelului lui Watson şi Crick de structură şi replicare a ADN au fost propuse mecanisme (alteraţii ale secvenţializării bazelor, deleţii, duplicaţii) care constituie baza moleculară a apariţiei mutaţilor somatice (49, 50, 54).

— Agenţii cancerigeni, în forma lor activă, sînt şi mutageni, proprietate demonstrată în sisteme microbiene şi eucariote.

b) *Teoria epigenetică a carcinogenezei.* Din datele prezentate reiese clar că majoritatea agenţilor cancerigeni au capacitatea de a modifica structura ADN. Este însă modificarea structurii ADN obligatorie pentru ca procesul de carcinogeneză să aibă loc? Întrucît nu există mijloace de analiză a structurii ADN, iar modificările structurii ADN nu pot fi detectate (cu excepţia microorganismelor), răspunsul la această întrebare nu este, deocamdată, cunoscut.

Se poate presupune, de aceea, că agenţii cancerigeni ar modifica activitatea genelor fără a schimba structura materialului genetic (27, 28, 63–65) şi că această activitate modificată a genelor este ereditară. Acceptînd această ipoteză, carcinogeneza ar fi întrucîtva asemănătoare cu procesul de diferenţiere. În decursul diferenţierii, dintr-o celulă unică avînd un anumit conţinut genetic (oul fertilizat) iau naştere celule cu expresii fenotipice diferite, care intră în constituţia ţesuturilor şi organelor, unde îndeplinesc funcţii specifice. Diferenţierea este rezultatul activării secvenţiale a genelor şi ea se realizează prin interacţiunea dintre anumite segmente ale ADN şi proteine specifice. Neoplaziile ar fi, prin analogie, datorite programării funcţionale greşite a unor gene normale (46). După Lipsett şi colab. (43), transformarea neoplazică a celulelor ar permite sinteze proteice care în condiţii obişnuite sînt represate. Acest fenomen este consecinţa pierderii unor mecanisme de control care, în mod normal, fac ca nu toată informaţia codificată în ADN să fie utilizată. Comparînd profilul enzimatic al hepatoamelor experimentale Morris cu cel al ficatului embrionar, Potter a sugerat posibilitatea ca fiecare linie de hepatom să derive dintr-o celulă hepatică imatură, a cărei maturaţie a fost blocată într-o anumită etapă. Studiul sintezei imunoglobulinelor specifice de către plasmocitoamele de şoarece a dus la concluzia că plasmocitele neoplazice par oprite ireversibil la anumite niveluri de diferenţiere ale programului lor proteino-sintetizator (68). În sfîrşit, Abelev şi colab. (1) au demonstrat că celulele tumorale hepatice conţin un antigen prezent şi în ficatul embrionar,

Scanned with OKEN Scanner

dar care nu poate fi evidențiat în ficatul adult normal. Aceasta sugerează că informația genetică care se exprimă în embrion și care este apoi represată se poate reexprima în ficatul tumoral.

Mecanismele moleculare care stau la baza acestor funcții genetice alterate nu sînt cunoscute. O primă posibilitate ar putea fi reprezentată de pierderea unor proteine specifice cu rol de represor. În acest sens pledează observațiile lui Miller și Miller (48) care au constatat o corelație între activitatea cancerigenă a unor coloranți aminoazoici și capacitatea lor de a se combina cu anumite proteine hepatice. În alte studii, s-a demonstrat existența unei interacțiuni între cancerigeni și ARN (44, 76, 77). S-a sugerat că ARN mesager, care îndeplinește funcția de matrice pentru sinteza proteinelor, ar putea fi stabilizat ca urmare a interacțiunii cu sistemele de membrane intracelulare (reticul endoplasmatic, suprafața externă a membranei nucleare, suprafața internă a membranei plasmatice). S-ar produce astfel alterări ale membranelor, care ar deveni ereditare, deoarece o anumită membrană ar acționa ca matrice pentru propria sa sinteză. O asemenea modificare ereditară a unor membrane s-ar putea exprima fenotipic pe baza stabilizării matricei de ARN mesager (66).

Acceptînd ipoteza mutației somatice, rolul cromozomilor devine evident, începînd cu stadiile inițiale ale carcinogenezei. Conform teoriei epigenetice, alterarea funcțională inițială a activității genice ar antrena o „cascadă" de modificări funcționale și structurale al căror rezultat final este conversia celulei normale într-o celulă neoplazică (69). În această situație, achiziționarea modificărilor cromozomiale ar reprezenta o verigă în cadrul procesului de progresiune neoplazică.

În încercarea de a stabili rolul cromozomilor în transformarea chimică au fost examinate numeroase tumori induse prin injectarea experimentală a substanțelor chimice și au fost studiate modificările citogenetice care însoțesc transformarea malignă *in vitro*. Vom expune, în continuare, cîteva din rezultatele cele mai reprezentative.

13.2. **Aspectele citogenetice ale tumorilor induse chimic**

13.2.1. Sarcoame

Majoritatea tumorilor examinate au fost induse prin injectarea intramusculară sau subcutană a hidrocarburilor cancerigene (metilcolantren, dimetilbenzantracen, benzpiren). Un număr redus de tumori au fost obținute prin implantarea unor filme de material plastic sau

Scanned with OKEN Scanner

prin injectarea unor metale. Aspectul histologic al tumorilor corespunde unor fibrosarcoame cu diferite grade de diferențiere.

În sarcoamele induse cu hidrocarburi policiclice la *șoareci* (10, 29, 30, 71) au fost observate aspecte cromozomiale variate. Majoritatea cazurilor au fost aneuploide, numerele modale fiind dispuse între hiperdiploidie și hipotetraploidie. Cromozomii markeri, prezenți în unele tumori, au aspecte diferite. A fost observată o relație interesantă între nivelul ploidiei și durata perioadei de latență (10, 29): tumorile care apar după o perioadă de latență mai scurtă sînt, în general, peridiploide și antigenice, în timp ce tumorile care apar după o perioadă de latență mai îndelungată sînt peritetraploide și neantigenice.

Constituția citogenetică a sarcoamelor induse prin implantarea unor filme de material plastic a fost studiată de Brand și colab. (12) și Banerjee și Bates (3). Valorile modale variază între diploidie și hipertetraploidie, iar cromozomii markeri sînt necaracteristici.

Rezultate foarte interesante au fost obținute prin studiul sarcoamelor induse prin injectarea 7, 12-dimetilbenzantracenului la *șobolani*. Mitelman și Levan (51) au constatat că o mare parte a tumorilor prezentau trisomia cromozomului nr. 2. Ulterior, Levan și colab. (41) au demonstrat că alături de situațiile în care trisomia cromozomului nr. 2 este completă și ușor evidențiabilă, există trisomii parțiale, „mascate", ale acestui cromozom. În aceste cazuri, anumite porțiuni ale cromozomului nr. 2 sînt incluse în constituția unor cromozomi

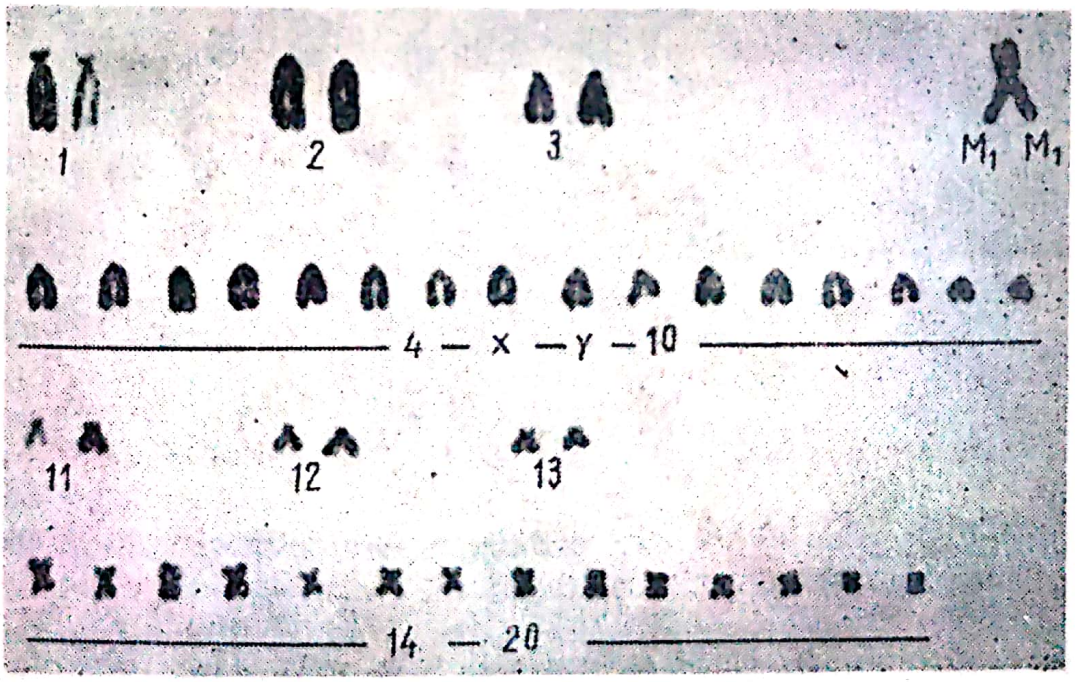


Fig. 53 — Cariotipul unei celule dintr-un sarcom indus cu nichel la șobolani. Se remarcă prezența cromozomului marker M.

Scanned with OKEN Scanner

markeri, originea lor putînd fi identificată cu ajutorul tehnicilor de bandare. Ahlström (2) a observat că trisomia cromozomului nr. 2 apare și în carcinoamele produse prin pensularea pielii cu 7, 12-dimetilbenzantracen. Trisomia cromozomului nr. 2 a fost remarcată și în sarcoamele induse cu metilcolantren și cu benzpiren (39, 40, 42), dar în aceste tumori incidența sa este mult mai mică. Există, pe de altă parte, sarcoame induse cu dimetilbenzantracen care au un cariotip normal sau care prezintă alte anomalii cromozomiale (61).

Injectarea intramusculară a unor metale duce uneori la apariția sarcoamelor. Foarte puține tumori au fost examinate din punct de vedere citogenetic. Într-un studiu asupra sarcoamelor induse prin injectarea nichelului la șobolani (62) am observat hiperdiploidie și apariția unor cromozomi markeri (fig. 53). În decursul transplantărilor seriate unii cromozomi markeri s-au dublat, datorită unui fenomen de nondisjuncție (fig. 54).

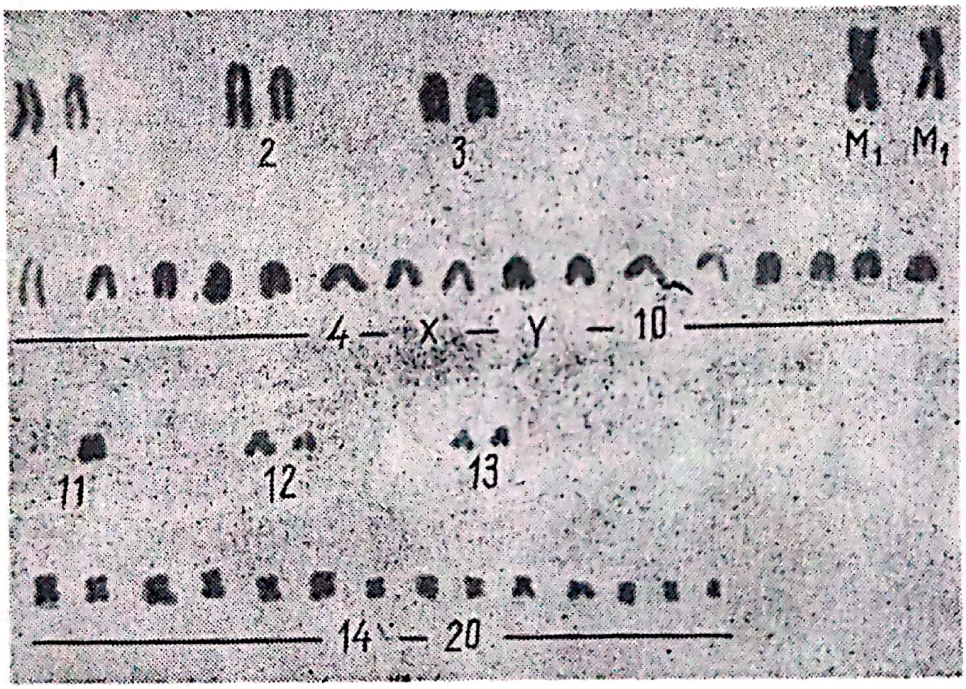


Fig. 54 — Cariotipul unei celule dintr-un sarcom indus cu nichel la șobolani. Cromozomul marker M apare în dublu exemplar.

Multe din tumorile primare induse prin inocularea 20-metilcolantrenului la *hamsterii sirieni* sînt diploide sau pseudodiploide. Nachtigal și colab. (56) au observat existența unei relații între durata perioadei de latență și frecvența celulelor diploide; tumorile cu o perioadă de latență mai scurtă au conținut o proporție mai mare de celule diploide decît tumorile cu perioada de latență mai inde-

Scanned with OKEN Scanner

lungată. În decursul transplantărilor seriate, tumorile diploide își modifică structura, devenind aneuploide (67).

Tumorile produse prin injectarea benzpirenului și a 7, 12-dimetilbenzantracenului la hamsterii sirieni nu prezintă trăsături particulare. Populațiile celulare au fost diploide, peridiploide sau tetraploide. Au fost observați cromozomi markeri, dar nu au apărut modificări cariotipice comune (23).

În tumorile induse prin injectarea 7, 12-dimetilbenzantracenului la *hamsterul chinez*, Mitelman și colab. (52) au observat un aspect cariotipic particular, constînd în interesarea perechii celei mai mici de cromozomi din cariotip (perechea nr. 11). Anomalia cea mai frecventă constă în trisomia acestor cromozomi; lipsa unui cromozom din această pereche a fost mai rar observată.

13.2.2. Leucemii

Leucemiile limfatice (34) și limfosarcoamele induse la *șoareci* (72) cu dimetilbenzantracen prezintă constant 41 de cromozomi (față de 40, cît este numărul normal, diploid). În limfosarcoamele timice induse la șoareci prin injectare de uretan, Colnaghi și colab. (16) au observat coexistența, în proporții diferite, a unor celule diploide și hiperdiploide. Celulele hiperdiploide aveau 41 de cromozomi, supranumerarul fiind asemănător autozomilor din perechea cea mai mică.

Kurita și colab. (37) au indus leucemii la 40 de *șobolani* prin injectarea intravenoasă a 7, 12-dimetilbenzantracenului. În 26 de cazuri au fost detectate anomalii cromozomiale, iar în 21 din aceste cazuri, anomaliile interesau perechile nr. 2 și 19. Cea mai frecventă anomalie a constat în trisomia perechii nr. 2; un număr mai mic de animale au prezentat trisomia perechii nr. 19. În cîteva cazuri, cele două anomalii au fost observate concomitent. Din punct de vedere citogenetic, trisomiile perechii nr. 2 realizează două aspecte principale: trisomii standard (în care sînt prezenți trei cromozomi nr. 2) și trisomii translocaționale (în care se observă doi cromozomi nr. 2, al treilea fiind implicat în procese de translocație cu cromozomi din alte perechi).

Ulterior, Kurita și colab. (38, 75) au demonstrat existența unei corelații între modificările citogenetice și tabloul hematologic al leucemiilor. Celulele care prezintă trisomia perechii nr. 2 se caracterizează printr-o citoplasmă intens bazofilă, care conține cîteva vezicule citoplasmatice. Aceste celule par să corespundă pronormoblaștilor sau normoblaștilor bazofili. S-a observat de asemenea o

Scanned with OKEN Scanner

tranziție a acestor celule spre normoblaști policromatofili. Aspectul morfologic al celulelor care prezentau concomitent o trisomie nr. 2 și o trisomie nr. 19 a fost deosebit de cel al celulelor cu trisomie nr. 2; nu au existat nici vezicule citoplasmatice, nici maturație eritroidă. Morfologia celulelor leucemice cu cariotip normal, diploid, a fost complexă și diferită de la caz la caz. În acest grup au fost observate leucemii variate, aparținînd seriei limfatice, granulocitare, monocitare, reticulare și eritroide. În general, celulele leucemice eritroide cu cariotip normal sînt mai imature decît cele cu trisomie nr. 2.

Aspectul citogenetic al leucemiilor induse cu 7, 8, 12- și 6, 8, 12-trimetilbenzantracen a fost asemănător cu cel al leucemiilor induse cu 7, 12-dimetilbenzantracen, ceea ce arată că trei carcinogeni diferiți structural acționează asupra celulelor hematoformatoare printr-un mecanism specific comun (74).

Mecanismul de apariție a acestor modificări cromozomiale, precum și relația lor cu procesul de leucemogeneză nu sînt încă precizate. Rees și colab. (70) au analizat modificările apărute în cromozomii celulelor medulare la 24 de ore după injectarea intravenoasă a unei doze unice de 7, 12-dimetilbenzantracen sau 7, 8, 12-trimetilbenzantracen. În aproape jumătate din metafazele examinate au fost observate rupturi ale cromozomilor. Cromozomii perechilor nr. 1 și 2 au fost afectați în mod preferențial, prezentînd mai multe rupturi decît era de așteptat pe baza lungimii lor. Sugiyama (73) a demonstrat că acele regiuni ale cromozomilor nr. 2 unde se localizează prereferențial rupturile prezintă o replicare tardivă, ceea ce sugerează o natură heterocromatică. Aceste rezultate confirmă ipoteza lui Natarajan și Ahnström (57) referitoare la localizarea preferențială a aberațiilor cromozomiale în regiunile heterocromatice. Apariția celulelor trisomice pentru cromozomul nr. 2 este probabil consecința unei nondisjuncții determinate de o asociere strînsă a cromatidelor surori, mediată de prezența blocurilor de heterocromatină.

Leucemiile granulocitare induse la șobolani prin instilarea intragastrică a 3-metilcolantrenului sînt, de obicei, diploide (58). Mori și Sasaki (55) au studiat, cu ajutorul unei tehnici de bandare, leucemiile induse cu N-nitrozobutiluree la șobolani. Un caz a fost diploid; în celelalte cazuri s-a observat pseudodiploidie, peridiploidie sau heteroploidie. Aceste rezultate arată că reorganizările genotipice profunde nu sînt obligatorii pentru constituirea neoplaziilor sistemului hematoformator.

Scanned with OKEN Scanner

13.2.3. Hepatoame

Studiul tumorilor hepatice ale şobolanilor a fost abordat din mai multe unghiuri: biochimic, histopatologic, citogenetic, cu intenţia de a se vedea dacă aceşti parametri variază în mod corelat. Unele tumori prezintă un ritm lent de creştere şi au un profil enzimatic mai puţin modificat în raport cu cel al ficatului normal (hepatoamele de „minimă deviaţie"). Alte tumori au un comportament mai agresiv şi prezintă modificări histologice şi biochimice mai accentuate.

O proporţie însemnată a hepatoamelor induse cu agenţi cancerigeni diferiţi (3'-metilaminoazobenzen, dietilnitrozamină, N-2-fluorenilacetamidă, N-2-fluorenildiacetamidă, 2-etilnitrozaminofluoren etc.) sînt diploide (4, 5, 31–33, 59, 60, 78). În unele cazuri, realitatea acestei diploidii a fost confirmată prin examenul detaliat al benzilor. Cînd apar modificări cromozomiale, ele sînt variabile, iar agentul chimic nu pare să aibă vreo semnificaţie în determinarea naturii sau extinderii acestor modificări.

Tumorile diploide sînt mai instabile şi prezintă tendinţa de a achiziţiona cromozomi suplimentari în decursul transplantărilor seriate. Modificarea constituţiei cromozomiale coincide, în general, cu o schimbare a ritmului de creştere, care devine mai rapid.

13.2.4. Alte tumori

Adenoamele pulmonare induse cu uretan la şoareci au prezentat celule hiperdiploide, hipodiploide sau pseudodiploide. Transformarea lor în carcinoame poate sau nu să fie însoţită de selecţia unei anumite populaţii celulare (17).

Tumorile rezultate în urma aplicării dimetilbenzantracenului pe *colul uterin* al şoarecilor (35) prezintă modificări cariotipice variate, nesistematizate.

În *tumorile mamare* produse la şobolani prin administrare de dimetilbenzantracen (11) sau metilcolantren (45) nu au fost observate anomalii cromozomiale particulare.

13.3. **Modificările cromozomiale şi transformarea chimică in vitro**

Tratarea culturilor de celule cu agenţi chimici cancerigeni determină, după cum am văzut, apariţia unor modificări care în ansamblul lor definesc fenomenul de transformare. În majoritatea

Scanned with OKEN Scanner

cazurilor, transformarea este însoțită de modificări evidente ale garniturii cromozomiale (6, 7, 15, 22, 24, 25, 36, 47, 62, 80). Cercetările lui DiPaolo și colab. (22, 24, 25) referitoare la transformarea celulelor de hamster au demonstrat că nu există nici o relație între structura chimică a agentului cancerigen și natura modificărilor cariologice. Transformarea produsă de diferiți cancerigeni se poate asocia cu apariția unor cromozomi markeri similari, dar nu toate liniile transformate prezintă aceiași markeri, chiar dacă se utilizează un agent transformator unic. Unii cromozomi markeri apar numai după pasaje repetate *in vitro* sau după injectarea celulelor la animale. În unele linii transformate numărul de cromozomi din celule crește, fără să fie însă interesat, în mod special, un anumit grup sau pereche de cromozomi.

Transformarea celulelor de șobolan este însoțită adesea de modificări structurale ale cromozomilor din perechile 1, 2 și 3 (47, 62). Întrucît noi am observat modificări similare și în celule tratate cu cancerigeni, dar care nu se transformaseră și nu erau tumorigene, existența unei relații directe între anomaliile cromozomiale și inițierea transformării maligne pare improbabilă (62). Modificările cromozomiale ar ptuea juca însă un rol important în progresiunea tumorală, caracterizată prin achiziționarea unor proprietăți noi care asigură autonomia celulelor tumorale, capacitatea de metastazare etc.

BIBLIOGRAFIE

1. ABELEV G. I., PEROVA S. D., KHRAMKOVA N. I. și colab. — *Biokhimiya*, 1963, *28*, 625.
2. AHLSTRÖM U. — *Hereditas*, 1974, *78*, 235.
3. BANERJEE M. R., BATES R. R. — *Brit. J. Cancer*, 1966, *20*, 555.
4. BECKER F. F., FOX R. A., KLEIN K. M., WOLMAN S. R. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1971, *46*, 1 261.
5. BECKER F. F., WOLMAN S. R., ASOFSKY R., SELL R. — *Cancer Res.*, 1975, *35*, 3 021.
6. BENEDICT W. F. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1972, *49*, 585.
7. BENEDICT W. F., GIELEN J. E., NEBERT D. W. — *Int. J. Cancer*, 1972, *9*, 435.
8. BERWALD Y., SACHS L. — *Nature (Lond.)*, 1963, *200*, 1182.
9. BERWALD Y., SACHS L. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1965, *35*, 641.
10. BIEDLER J. L. — *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, 1962, *3*, 304.
11. BISHUN N. P., MILLS J., LLOYD N., WILLIAMS D. C. — *Europ. J. Cancer*, 1973, *9*, 865.
12. BRAND K. G., BUOEN L. C., BRAND I. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1967, *39*, 663.
13. CASSINGENA R., SUAREZ H. — *Int. J. Cancer*, 1967, *2*, 521.
14. CASTO B. C., DI PAOLO J. A. — Viruses, chemicals and cancer (manuscris).
15. CHEN T. T., HEIDELBERGER C. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1969, *42*, 915.

Scanned with OKEN Scanner

14. CROMOZOMII ŞI CARCINOGENEZA VIRUSALĂ

14.1. Introducere

Una din primele ipoteze asupra originii virotice a cancerului a fost emisă în anul 1903 de către Borrell (13), care a remarcat că infecţiile cu virusuri ale bolilor eruptive determină adesea răspunsuri celulare proliferative. Ellermann şi Bang (26) şi Rous (88) au adus dovezi experimentale convingătoare, reuşind transmiterea acelulară a leucemiei şi, respectiv, a sarcoamelor aviare. Ulterior, s-a demonstrat că numeroase virusuri au capacitatea de a induce tumori la animale, iar studiul carcinogenezei virusale a adus date preţioase referitoare la evenimentele care au loc la nivel molecular în decursul transformării maligne.

În funcţie de materialul lor genetic, virusurile se clasifică în două grupe: virusuri ADN şi virusuri ARN.

1) *Virusurile oncogene ADN* cuprind următoarele categorii:

a) *Adenovirusurile*, care cuprind 48 de tipuri imunologice, dintre care 31 sînt de origine umană.

b) *Virusurile papova*, care includ virusul SV40 — un virus simian, virusul polyoma — un virus al şoarecelui şi virusurile papiloamelor umane, bovine, canine şi ale iepurilor.

c) *Virusurile herpetice*, care includ virusul *herpes simplex* de tip 1 şi 2, virusul bolii Marek şi virusul Epstein-Barr.

2) *Virusurile tumorale ARN* cuprind oncornavirusurile de tip aviar şi murin.

a) *Virusurile aviare* includ virusul mieloblastozei şi virusul sarcomului Rous, care cauzează leucemii şi, respectiv, sarcoame la pui.

b) *Virusurile tumorale murine* pot fi clasificate, pe baza speciei la care au fost izolate, în virusuri ale şoarecilor, şobolanilor, hamsterilor şi felinelor. Cei mai cunoscuţi reprezentanţi sînt virusurile complexului leucemii-sarcoame murine şi virusul tumorilor mamare murine.

Scanned with OKEN Scanner

14.2. **Generalități asupra carcinogenezei virusale**

Celulele infectate cu virusuri oncogene *in vitro* prezintă anumite modificări ereditare ale proprietăților lor, descrise sub numele generic de „transformare", în timp ce *injectarea virusurilor la animale sensibile* duce la apariția tumorilor.

1) *Utilizarea sistemelor de culturi de celule* prezintă anumite avantaje față de sistemele *in vivo*, dintre care menționăm: fenomenul de oncogeneză poate fi analizat la nivel molecular, în condiții controlate; perioada de latență este mult scurtată, o colonie transformată putînd fi izolată după o săptămînă de la infectarea culturii, în timp ce pentru dezvoltarea cancerului *in vivo* este necesară o perioadă de luni de zile; sînt prezente mai puține variabile, evitîndu-se îndeosebi intervenția mecanismelor imunologice ale gazdei.

Ansamblul de modificări care caracterizează celulele transformate cuprind (10):

a) *Morfologia celulelor.* Transformarea este însoțită de obicei de modificarea morfologiei celulelor. În general, celulele transformate de virusul polyoma au o formă fuzocelulară, celulele transformate de virusul SV40 sînt mari și au o formă poligonală, iar celulele transformate de adenovirusuri sînt celule epiteliale mici.

b) *Pierderea inhibiției de contact.* Culturile de celule netransformate, aflate sub influența factorilor de control ai creșterii, prezintă fenomenul de „inhibiție de contact", manifestat printr-o creștere într-un singur strat a celulelor, care prezintă o dispoziție regulată, în șiruri paralele sau în vîrtejuri. Celulele transformate, care își pierd inhibiția de contact, continuă să se dividă și după realizarea confluenței, formînd colonii multistratificate. Orientarea celulelor este alterată, ele încrucișîndu-se în diferite sensuri.

c) *Modificări cariologice.* Transformarea este de obicei însoțită de modificări cromozomiale, care vor fi prezentate în paragrafele următoare.

d) *Autonomia celulelor transformate.* Celulele netransformate au o durată limitată de creștere *in vitro, după* care degenerează și mor. Celulele transformate dobîndesc proprietatea de a crește indefinit, formînd linii celulare. Ele manifestă, în același timp, o rezistență crescută față de condiții de mediu letale pentru celulele parentale normale (medii de cultură cu concentrații foarte scăzute de ser, temperaturi ridicate sau joase, culturi pe agar semisolid etc.).

Scanned with OKEN Scanner

e) *Achiziționarea potențialului malign.* Celulele transformate dobîndesc capacitatea de a induce tumori în urma injectării la animale.

2) *In vivo*, oncogeneza virusală este definită, simplu, prin capacitatea de a induce apariția cancerului. Nu întotdeauna această proprietate se manifestă la specia care reprezintă gazda naturală a virusului. Este cazul virusului simian 40 (SV40), care induce cancere prin injectarea la hamsteri nou-născuți, dar nu și la maimuța verde africană.

14.3. **Interacțiunea dintre virusuri și celule**

Interrelațiile care se stabilesc între virusuri și celule depind de natura virusului, ele fiind diferite în cazul virusurilor ADN și al virusurilor ARN.

14.3.1. Interacțiunea dintre virusurile ADN și celule

Soarta celulelor infectate de un virus ADN este condiționată de tipul de relație care se stabilește între virusul infectant și celulele respective. În cazul infecției litice, caracterizate prin liza celulelor infectate, transformarea nu este, desigur, posibilă. În cazul infecției nelitice se poate stabili o succesiune de evenimente al căror rezultat final este transformarea celulelor. Principalele modificări care urmează infecției cu virusuri oncogene ADN sînt (120):

a) *Inducerea enzimelor.* Activitatea unor enzime implicate în sinteza ADN (timidinkinaza, timidilatsintetaza, polimeraza ADN etc.) crește mult după infecția cu virusuri oncogene ADN. Există două categorii de argumente care sugerează că enzimele induse sînt codificate de informația genetică a celulei gazdă și nu de virus: în primul rînd, proprietățile fizico-chimice ale enzimelor induse sînt similare cu cele ale enzimelor din celulele normale; în al doilea rînd, informația genetică conținută în genomul viral este foarte redusă. Astfel, virusurile SV40 și polyoma au o informație genetică corespunzătoare pentru numai 6–10 proteine. Acțiunea virusurilor ar consta în anihilarea proceselor sau substanțelor inhibitorii care, în condiții normale, limitează producerea acestor enzime. Este totuși posibil ca cel puțin unele enzime să fie codificate de genomul virusal.

Scanned with OKEN Scanner

b) *Derepresia sintezei celulare de ADN.* Inducerea sau stimularea sintezei de ADN în celulele infectate reprezintă una din caracteristicile comune ale virusurilor oncogene. Se pare că sinteza celulară de ADN este necesară pentru a fixa sau integra ADN-ul viral.

c) *Inducerea antigenelor celulare.* Infectarea celulelor cu virusuri induce apariţia unor antigene celulare specifice. Antigenele T (tumorale) sînt observate în nucleii celulelor infectate cu virus, precum şi în tumorile induse cu virusuri la animale. Antigenele de transplantare tumorale specifice (TSTA) au fost detectate pe suprafaţa celulelor transformate. Ele se deosebesc de antigenele T atît prin localizare, cît şi pe baze imunologice.

d) *Integrarea genomului viral.* Dovezile în favoarea faptului că genomul viral, sau cel puţin o parte a sa, este prezent în celulele transformate, pot fi sistematizate astfel:

– Prin experienţe de hibridare a acizilor nucleici s-a demonstrat prezenţa ADN sau ARN specific viral în celulele transformate.

– Virusul infecţios poate fi recuperat prin co-cultivare sau prin fuzionare cu celule sensibile. Astfel, atunci cînd o celulă de hamster transformată cu virus SV40, care nu produce virus infecţios, este fuzionată cu o celulă normală de maimuţă verde, virusul începe curînd să se multiplice şi pot fi recuperate particule virale.

– Shani şi colab. (92) au reuşit să transfere cromozomi izolaţi din celule de hamster chinez transformate cu virus SV40 în celule permisive BSC1. Acest transfer cromozomial a avut drept rezultat apariţia antigenului T SV40 şi activarea virusului infecţios. Aceste date demonstrează localizarea cromozomială a genomului SV40. În acelaşi sens pledează experienţele lui Weiss (114). Autoarea a hibridat celule umane transformate cu virus SV40 cu celule de şoarece netransformate. În decursul cultivării, celulele hibride au pierdut treptat cromozomii umani. După 50 de generaţii, cînd celulele pierduseră 90–97% din cromozomii umani, antigenul T codificat de genomul viral nu a mai putut fi detectat, ceea ce susţine ipoteza integrării genomului viral în cromozomii umani.

Se pare că fixarea ADN viral pe ADN celular are loc prin legături covalente. Nu s-a precizat încă dacă integrarea genomului viral se face într-un anumit cromozom al celulei gazdă sau dacă ea are loc întîmplător. În cazul virusului SV40, Croce şi colab. (22) au arătat că transformarea celulelor umane şi formarea antigenelor T şi TSTA este condiţionată de integrarea genomului SV40 în cromozomul nr. 7. În mod similar, expresia antigenului T în celulele de maimuţă verde transformate de un hibrid adeno 7-SV40 este asociată cu integrarea genomului SV40 într-un cromozom specific al acestor celule (21).

Scanned with OKEN Scanner

14.3.2. Interacţiunea dintre virusurile ARN şi celule

Majoritatea virusurilor ARN sînt citocide. În vederea replicării ARN-ului viral, virusul infectant îşi construieşte o copie bicatenară, intermediarul replicativ, care serveşte drept matrice pentru formarea de virusuri ARN progene.

Replicarea virusurilor tumorale ARN este cu totul diferită, ele neavînd un intermediar replicativ de tip ARN, ci unul de tip ADN. Acest model a fost propus pe baza a două categorii de experienţe:

a) Actinomicina D, un antibiotic care inhibă specific sinteza de ARN dependentă de ADN, nu influenţează replicarea unora din virusurile ARN, în condiţii care sînt inhibitorii pentru virusurile sarcoamelor aviare. Ulterior, sensibilitatea replicării la actinomicina D s-a dovedit a fi o proprietate generală a virusurilor tumorale ARN.

b) Studiile de hibridare a acizilor nucleici au demonstrat că celulele infectate conţin un ADN nou, ale cărui secvenţe bazice sînt complementare ARN-ului viral.

Funcţionalitatea acestui model unic în biologie – ARN acţionînd ca matrice pentru sinteza de ADN – este asigurată de o enzimă, polimeraza ADN dependentă de ARN (5, 94, 106), a cărei existenţă a fost confirmată în toate virusurile tumorale ARN.

Acest ADN nou sintetizat, provirusul, este probabil integrat într-o anumită regiune din genomul gazdei. Intervenind în mod direct în controlul trăsăturilor fenotipice ale celulei infectate, provirusul se comportă ca o genă celulară (102, 103). Fiind integrat în ADN-ul celular, provirusul este probabil replicat şi separat în celulele fiice în acelaşi fel ca şi ADN-ul celular.

14.4. **Mecanismele posibile ale carcinogenezei virusale**

Ipotezele care încearcă să explice transformarea neoplazică indusă de virusuri pot fi sistematizate astfel (104, 105):

a) Conform *ipotezei mutaţiei*, celulele normale nu conţin genele responsabile pentru apariţia cancerului, acestea apărînd în decursul carcinogenezei. Această ipoteză, care în esenţă presupune mutaţia materialului genetic preexistent, pare să corespundă mai ales modelului de transformare chimică. Ea nu poate fi însă exclusă nici în cazul virusurilor, a căror acţiune asupra fusului mitotic şi a cromozomilor ar putea fi răspunzătoare de apariţia unor mutaţii somatice (76). Dealtfel, Burdete şi Yoon (15) au produs mutaţii la *Drosophila* prin infectare cu linia Schmidt-Ruppin a virusului sarcomului Rous.

Scanned with OKEN Scanner

b) *Ipoteza virogenelor*, susținută de Huebner și Todaro (37), presupune că toate animalele conțin în genomul lor informația necesară și suficientă pentru a converti celula normală în celulă malignă și a produce virusul tumoral corespunzător. Segmentul malign ar rămîne de obicei neexprimat; activarea sa de către factorii extrinseci sau intrinseci ar determina apariția virusului și declanșarea cancerului.

Recent, ipoteza virogenelor a fost testată prin studiul a două perechi de gemeni monozigoți. În fiecare caz, membrul leucemic al perechii a prezentat secvențe de ADN care nu au putut fi detectate în leucocitele fratelui geamăn sănătos. Acest fapt implică inserția postzigotică a informației adiționale observate în ADN-ul membrilor leucemici ai perechilor de gemeni și reprezintă un argument împotriva ipotezei virogenelor, conform căreia secvențele specifice leucemiei, prezente în ADN-ul unui bolnav, ar fi trebuit să existe și în genomul fratelui său geamăn monozigot (93).

c) *Ipoteza protovirusului*, susținută de Temin (105), presupune că transferul de informație ARN → ADN are loc și în condiții obișnuite. În organismul normal, un segment de ADN din celula A ar servi drept matrice pentru sinteza unui ARN care este transferat celulei B. În celula B, ARN-ul transferat servește drept matrice pentru sinteza unui ADN nou (cu participarea polimerazei ADN dependentă de ARN). Acest ADN nou este apoi integrat în ADN-ul celulei B, care devine astfel deosebită de celula A. Prin repetare, procesul ar putea amplifica variabilitatea genomului celulelor somatice, constituind substratul posibil al diferențierii. Sub acțiunea unor agenți cancerigeni (substanțe chimice, iradiere) s-ar produce greșeli în transmiterea fluxului de informație în sistemul ADN → ARN → ADN. Acest proces nu ar necesita formarea unui virus tumoral ARN, ci numai modificarea informației din celule, cu apariția informației necesare pentru malignizare. Informația necesară transformării neoplazice poate sau nu să fie omoloagă cu informația conținută în virusurile tumorale ARN.

O ultimă problemă care trebuie discutată este aceea a *interacțiunii dintre virusuri și agenții chimici*. S-a demonstrat că animalele tratate cu o combinație de cancerigeni chimici și virusuri oncogene sau neoncogene prezintă o incidență mai mare a tumorilor decît animalele inoculate numai cu virus sau numai cu agentul chimic. Carcinogenii chimici ar putea stimula carcinogeneza virală prin unul din următoarele mecanisme (17):

– afectarea răspunsului imunologic al gazdei față de virus;
– modificarea susceptibilității celulelor față de infecția virală;
– acțiune directă asupra virusului, în sensul producerii unei cantități crescute de virus tumorigen;

Scanned with OKEN Scanner

– acțiune conjugată cu a virusurilor asupra aceluiași element genetic critic din celula gazdă;

– activarea unor virusuri latente, care ar putea participa la procesul neoplazic.

14.5. Tipuri de modificări cromozomiale produse de virusuri

Leziunile cromozomiale elementare sînt comune pentru diferite categorii de virusuri. Ele constau în modificări numerice și aberații structurale (99):

a) *Modificări numerice.* Modificările cromozomiale numerice sînt de cele mai multe ori consecința anomaliilor aparatului mitotic (microtubulii care compun fusul și centrozomii). În absența fusului, cromozomii metafazici se răspîndesc în citoplasmă. Ei se grupează adesea, înconjurîndu-se de o membrană și formînd micronuclei. Aceștia pot fuziona într-un nucleu unic, realizîndu-se astfel dublarea numărului de cromozomi. O altă posibilitate de poliploidizare este reprezentată de endoreduplicare, o duplicare a numărului de cromozomi în absența diviziunii mitotice și a dizolvării membranei nucleare.

Aneuploidia poate fi o consecință a mitozelor multipolare, în care distribuția cromozomilor este inegală. Ea este însă, mai adesea, determinată de nondisjuncția cromozomilor sau de pierderi ale cromozomilor care, ca urmare a funcției deficitare a fusului, nu se mai deplasează spre poli în decursul anafazei (cromozomi retardatari).

Apariția celulelor multinucleate este fie consecința unor mitoze incomplete, cu diviziune nucleară dar nu și citoplasmatică, fie a fuziunii celulelor. Fenomenul de fuziune celulară poate fi indus de o varietate de virusuri (virusul Sendai, virusul *herpes simplex*, virusul parotiditei etc.). De obicei, ca urmare a sincronizării evenimentelor din nucleii celulelor multinucleate (policariocite), aceștia intră simultan în mitoză. Se formează un singur fus mitotic, iar rezultatul diviziunii îl constituie apariția a două celule fiice poliploide.

b) *Aberațiile structurale* ale cromozomilor care pot fi induse de virusuri sînt extrem de complexe: rupturi și lacune cromtidice și cromozomice, rearanjamente. Ca rezultat pot apărea cromozomi cu o morfologie anormală (markeri). Cînd rupturile cromatidice interesează mai mulți cromozomi din aceeași metafază, se vorbește despre fragmentare. În cazul pulverizării, cromozomii sînt reduși la piese cromatidice granulare (fig. 55). Este problematic dacă în acest caz este vorba de o rupere reală a cromozomilor sau de anomalii ale spiralizării (condensare cromozomială prematură) rezultate din fuziunea unei celule în mitoză cu o celulă interfazică (99).

Scanned with OKEN Scanner

Rupturile ar putea fi consecința unei acțiuni directe sau indirecte a virusurilor. În cazul virusurilor ARN, care nu interacționează cu ADN-ul celular, acțiunea trebuie să fie indirectă (33). Ea ar putea rezulta din activitatea enzimelor lizozomale eliberate în urma infecției virale (2, 3) sau a enzimelor asociate virionului sau codificate de un

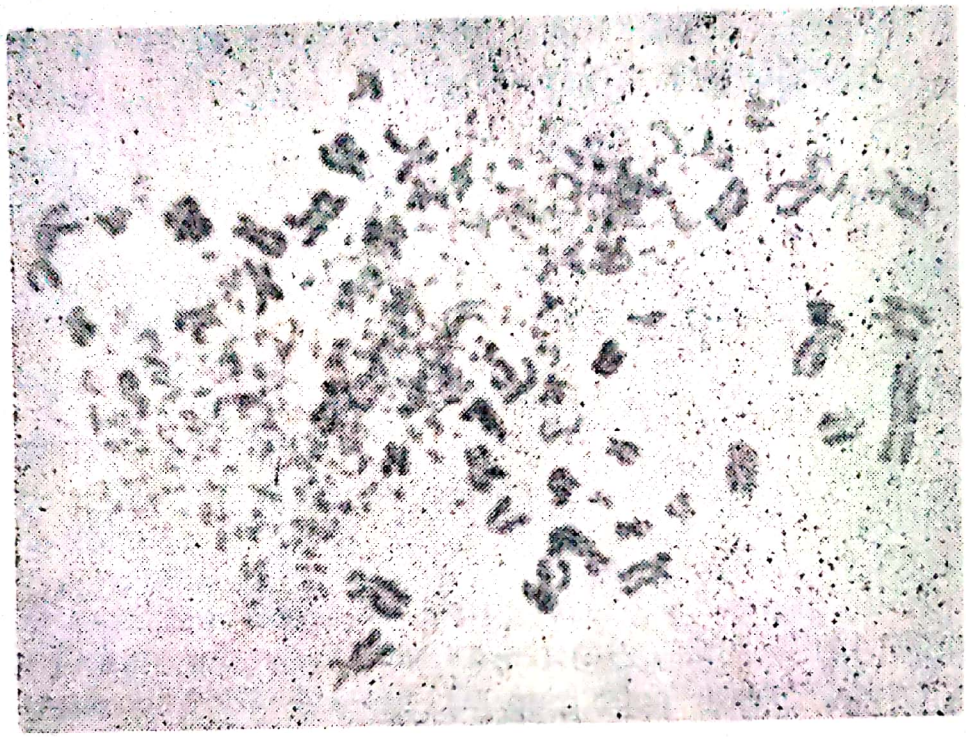


Fig. 55 — Pulverizare cromozomială.

ARN mesager timpuriu. În cazul virusurilor ADN, rupturile ar putea reprezenta sedii de integrare a virusului.

În sistemele *in vitro*, instabilitatea cariotipică persistă multe generații, iar celulele prezintă o variabilitate extremă. În tumorile induse prin inocularea virusului la animale se constituie, încă din stadiile precoce, linii sușă bine individualizate. Se pare că această deosebire nu este determinată de diferențe în mecanismele celulare ale carcinogenezei și că ascendența unei anumite linii celulare *in vivo* este consecința selecției care are loc în aceste condiții (33).

14.6. **Efectele virusurilor ADN**

14.6.1. Adenovirusuri

Cercetările experimentale au demonstrat că majoritatea adenovirusurilor au potențial oncogen, dar rolul lor în etiologia tumorilor spontane nu a putut fi încă dovedit. Majoritatea cercetărilor cito-

Scanned with OKEN Scanner

genetice se referă la adenovirusul tip 12, care are o oncogenitate înaltă, dar există și lucrări în care a fost analizat, comparativ, efectul altor adenovirusuri.

a) *Adenovirusul tip 12.* Efectul precoce al adenovirusului tip 12 asupra celulelor de hamster chinez constă în apariția unui număr mare de anomalii, îndeosebi interschimburi cromatidiene și cromozomi inelari, dar și cromozomi dicentrici, lacune și rupturi (96). În celulele de hamster sirian, infecția cu adenovirus 12 duce la apariția rupturilor cromatidice și cromozomice, a endoreduplicărilor și a pulverizării (16, 20, 96, 97). Nivelul anomaliilor este proporțional cu doza de virus (20). Faptul că anomaliile cromozomiale nu sînt corelate cu procesul de formare a virionului matur sau cu sinteza antigenelor structurale demonstrează că afectarea cromozomilor este consecința unor evenimente timpurii (48). În același sens pledează și faptul că iradierea cu raze ultraviolete, care blochează replicarea virusului, nu previne producerea de leziuni cromozomiale (98).

Problema specificității leziunilor induse de adenovirusul 12 este încă discutată. Nichols și colab. (77) au constatat că punctele de ruptură sînt distribuite la întîmplare pe cromozomii celulelor umane. Zur Hausen susține că în culturile de rinichi embrionar uman ar apărea aberații cromozomiale specifice, constînd în rupturi situate la nivelul constricților secundare ale cromozomilor 17 și 1 (121). În mod similar, Mc Dougall (58) a remarcat că liniile celulare umane pozitive pentru antigenul T indus de adenovirusul 12 prezentau o despiralizare specifică a brațelor lungi ale cromozomului 17. Utilizarea virusului marcat cu TdR-H^3 nu a indicat însă că aceste puncte ar reprezenta sedii preferențiale de inserție a virusului. În fibroblastele umane derivate de la pacienții normali și de la bolnavi cu anomalii genetice, adenovirusul 12 induce atît aberații cromozomiale specifice, cît și leziuni nespecifice.

Celulele de hamster chinez transformate de adenovirusul 12 sînt predominant diploide. Anomaliile cromozomiale care apar în unele celule sînt variabile și lipsite de specificitate (14).

Tumorile primare și transplantate ale hamsterului sirian au fost studiate atît cu metode directe, cît și după o prealabilă cultivare *in vitro* (6, 82, 97, 100, 108). Aceste tumori nu produc virus infecțios, dar conțin antigenul T codificat de genomul viral. Cele două caracteristici principale ale tumorilor induse cu adenovirus 12 la hamsteri sînt: prezența unor clone multiple, fiecare cu un anumit cariotip anormal; incidența extrem de înaltă a aberațiilor cromozomiale (rupturi, fragmentări, cromozomi inelari și dicentrici, endoreduplicări) (99). Această instabilitate pronunțată a cariotipului, care determină tabloul neo-

Scanned with OKEN Scanner

bișnuit de tumori policlonale, „mozaicate", ar putea fi consecința persistenței ADN-ului viral în celule (100).

Tumorile induse la șoareci sînt însă, adesea, diploide. Aneuploidia, poliploidia și aberațiile cromozomiale structurale sînt mult mai puțin frecvente (28). Această deosebire ar ptuea fi determinată de diferențe între liniile de virusuri utilizate sau ar putea reflecta o susceptibilitate variată a speciilor față de infecția cu adenovirusul 12.

b) *Alte adenovirusuri.* Stich și Yohn (98) și Cooper și colab. (20) au studiat efectul unor adenovirusuri umane și simiene, avînd potențialuri oncogene diferite, asupra celulelor de hamster sirian. Toate virusurile testate au indus anomalii cromozomiale, dar nu a fost evidențiată o corelație între tipul modificărilor cromozomiale și capacitatea oncogenă a virusurilor. Rezultate diferite au fost obținute de Mc Dougall (57), care a observat că adenovirusurile 18 și 13, care au un potențial oncogen înalt, produc, asemenea adenovirusului 12, leziuni specifice ale cromozomilor 17 din celulele umane. Acest fenomen nu a fost observat în culturile infectate cu adenovirus 2 (care nu produce tumori la hamsteri) și adenovirus 7 (slab oncogenic), unde modificările cromozomiale au avut o distribuție întîmplătoare.

Bey și Whitcutt (8, 9) au examinat culturi de celule transformate cu adenovirus simian SA7. În mai multe clone transformate au fost observați doi cromozomi markeri, cărora li s-a conferit o oarecare specificitate: un cromozom metacentric, derivat probabil dintr-un cromozom nr. 7–9, și un cromozom subtelocentric, derivat dintr-un cromozom X.

Utilizînd o tehnică de bandare Giemsa, am constatat că unele clone de celule de hamster sirian transformate cu adenovirus SA7 erau diploide sau pseudodiploide, în timp ce altele erau aneuploide și prezentau diferiți cromozomi markeri (81). Nu am observat însă existența unui model cromozomial asociat în mod constant cu transformarea indusă de virusul SA7.

14.6.2. Virusurile papova

a) *Virusul simian 40 (SV40).* Există puține studii referitoare la efectele imediate ale infecției cu SV40 asupra culturilor de celule. În culturile de fibroblaste umane au fost observate, într-o perioadă inițială, lacune și rupturi cromozomiale (116). După cîteva zile apar cromozomi dicentrici și interschimburi cromatidice. Exceptînd pierderea preferențială a unui cromozom X, leziunile par să se repartizeze uniform în cariotip. Prezența asociațiilor telomerice, precum și dispoziția preferențială a leziunilor la nivelul zonelor pericentromerice, a constricțiilor secundare și a telomerelor, adică în regiunile unde

Scanned with OKEN Scanner

se localizează secvențele repetitive ale ADN, sugerează că acest ADN repetitiv ar putea reprezenta punctul de atac (direct, prin integrare, sau indirect, prin activitate enzimatică) al SV40 (69).

Transformarea celulelor diploide umane de către SV40 pare să urmeze un model strict secvențial, dar relația exactă dintre momentul apariției modificărilor cromozomiale și transformare nu este încă stabilită. Girardi și colab. (30) au observat o corelație directă între apariția anomaliilor cromozomiale și pierderea inhibiției de contact. După Weinstein și Moorhead (113), pierderea inhibiției de contact, care reprezintă o latură a procesului de transformare, survine în absența unor modificări morfologice și cromozomiale detectabile. La scurt timp după pierderea inhibiției de contact, frecvența celulelor cu anomalii a crescut brusc, atingînd 70%. Instalarea anomaliilor cromozomiale a precedat apariția modificărilor morfologice ale celulelor. Pe baza acestor date, autorii au presupus că prezența anomaliilor cromozomiale vizibile nu reprezintă un eveniment esențial în instalarea transformării.

Culturile de fibroblaste umane aneuploide (65, 91) și celulele prelevate de la pacienții care prezintă sindroame de instabilitate cromozomială determinată genetic (1) sînt transformate de virusul SV40 cu o eficiență mai mare decît fibroblastele diploide.

Celulele umane transformate prezintă modificări cromozomiale complexe și generalizate (47, 65, 66, 68, 90, 112, 113, 119). Prezența unei instabilități cromozomiale persistente, demonstrată de rupturile cromatice și cromozomice și de cromozomii dicentrici, reprezintă un obstacol în selectarea unor clone anormale definite. Moorhead și Saksela (65) au observat o afectare preferențială a cromozomilor din grupele D și G, fie prin eliminarea lor din celule, fie prin rearanjamente.

Efectele virusului SV40 asupra celulelor de hamster sirian au fost studiate de Cooper și Black (18, 19), Nachtigal și colab. (71, 72), Wicker și colab. (115) și Prunieras și Jacquemont (83). Instabilitatea cromozomială persistă mult timp după transformare, fenomen care pare a fi determinat de prezența continuă a genomului viral (33).

Nachtigal și colab. (71) au observat că diferitele țesuturi ale hamsterului sirian prezintă o susceptibilitate variată la acțiunea SV40, manifestată prin apariția unui număr diferit de metafaze cu aberații cromozomiale structurale. Celulele transformate de variantele mai oncogene SV40-PARA, care au un genom de SV40 și o capsidă de adenovirus, prezintă o cantitate crescută de anomalii cromozomiale. Două linii de celule pulmonare de hamster au făcut excepție de la acest comportament. Aceste celule au prezentat anumite particularități: în prima linie, antigenul T SV40 a fost localizat în citoplasma celulelor; în a doua linie, antigenul T adeno nu a putut fi detec-

Scanned with OKEN Scanner

tat. May și colab. (53) au arătat că în celulele de rinichi de șoarece infectate cu SV40, transcrierea unui mesager virusal timpuriu și sinteza antigenului T au fost urmate de o replicare a cromozomilor și de apariția unei instabilități cromozomiale. În sfîrșit, în celulele renale de hamster sirian transformate de SV40, capacitatea oncogenă este condiționată de prezența activității timidinkinazice și a aberațiilor cromozomiale. Toate aceste date sugerează existența unei relații între antigenul T, timidinkinaza indusă viral, apariția aberațiilor cromozomiale și transformare (69).

În tumorile primare și transplantate induse cu virus SV40 la hamsteri sirieni (70), precum și în culturile de tumori (82) a fost observată prezența aneuploidiei și pseudodiploidiei și apariția cromozomilor markeri.

Există foarte puține cercetări referitoare la acțiunea SV40 asupra altor specii. Fernandes și Moorhead (27) au studiat efectul SV40 asupra unei linii de rinichi de maimuță. Celulele transformate au prezentat mai multe anomalii (cromozomi dicentrici, inelari etc.) decît celulele martore și au evoluat spre aneuploidie. O linie de fibroblaști de șoarece transformată cu SV40 a prezentat o omogenitate citogenetică remarcabilă. O trăsătură distinctă a acestei linii a constituit-o trisomia cromozomilor nr. 3 (45).

b) *Virusul polyoma.* Efectele virusului polyoma variază în funcție de natura celulelor infectate. În celulele de hamster chinez infectate cu virus polyoma nu au fost observate anomalii cromozomiale (29, 118). Atît celulele transformate menținute *in vitro*, cît și tumorile rezultate în urma inoculării la animale au rămas diploide (118).

Dimpotrivă, în celulele de hamster sirian au fost evidențiate, la scurt timp după infectare, numeroase rupturi cromozomiale, care explică apariția cromozomilor markeri (109). Secvențializarea apariției modificărilor cromozomiale este similară cu cea înregistrată în cazul transformării cu SV40. Creșterea anormală a celulelor, care reprezintă unul din primele semne ale transformării, a precedat apariția anomaliilor cromozomiale majore (23, 60). Aberațiile cromozomiale se instalează apoi treptat, ducînd în cele din urmă la apariția unei populații celulare heterogene. Nu au fost observate deosebiri cariotipice între liniile de celule care produc virus și liniile în care nu se constată formare de virus (24).

În tumorile induse cu virusul polyoma la hamsterii sirieni, Defendi și Lehman (24) au observat anomalii cromozomiale variate, constînd în pseudodiploidie, aneuploidie și apariția unor cromozomi markeri. Faptul că în aceste tumori apar frecvent monosomii și trisomii ale cromozomilor 1 și 21, precum și un cromozom marker submetacentric

Scanned with OKEN Scanner

cu o morfologie particulară sugerează afectarea preferențială a anumitor cromozomi (24).

Yamamoto și colab. (117) susțin existența unui control cromozomial al malignității în tumorile rezultate din inocularea celulelor de hamster sirian transformate de virusul polyoma. Conform modelului sugerat de acești autori, genele responsabile de expresia malignității ar fi localizate pe un anumit cromozom (identificat, în sistemul de nomenclatură adoptat de autor, drept cromozomul 5_6). Sînt necesare noi confirmări înainte ca aspectele generale ale acestei teorii să poată fi acceptate.

La șoareci, aproximativ 25% din tumori sînt diploide; celelalte tumori sînt aneuploide, unele dintre ele prezentînd și cromozomi markeri. În decursul transplantărilor, unele tumori și-au modificat constituția, devenind aneuploide (34–36).

c) *Virusul papilomului.* Injectarea subcutană a iepurilor cu virusul papilomului Shope induce apariția unor tumori benigne care pot evolua spre malignizare, astfel încît acest sistem oferă posibilitatea studierii comparative a constituției cromozomiale a tumorilor benigne, a stadiilor tranziționale și a carcinoamelor pavimentoase (99). Tumorile benigne sînt, în general, diploide. În tumorile maligne apar modificări cromozomiale numerice și structurale (7, 79).

McMichael și colab. (59) au confirmat diploidia papiloamelor benigne și heteroploidia tumorilor maligne derivate din papiloame. Într-un papilom benign, autorii au constatat totuși prezența unei pseudodiploidii, caracterizată prin pierderea unui acrocentric mic, care este înlocuit cu un cromozom metacentric. Întrucît acest tablou a fost regăsit și de alți autori, este posibil ca el să aibă o anumită specificate. Prunieras și colab. (84) presupun că substratul acestei constituții citogenetice particulare este reprezentat de o trisomie a cromozomului acrocentric mic: unul din cromozomi rămîne liber, iar ceilalți doi realizează, printr-un proces de translocație reciprocă, cromozomul metacentric.

14.6.3. Virusurile herpetice

S-a sugerat că unele virusuri aparținînd acestei grupe ar avea un potențial oncogen pentru om. Virusul *herpes simplex* a fost implicat ca agent etiologic al cancerului de buză și de col uterin, dar dovezile existente nu sînt suficient de convingătoare. S-a demonstrat însă că virusul *herpes simplex* are capacitatea de a transforma celulele de hamster (25) și de șobolan (73). Boala Marek, o afecțiune limfoproliferativă a puilor de găină, este determinată de

Scanned with OKEN Scanner

un virus herpetic. În sfîrşit, majoritatea autorilor admit că virusul Epstein-Barr este agentul cauzator al limfomului Burkitt. Întrucît aspectele citogenetice ale limfomului Burkitt au fost deja prezentate, ne vom limita la studierea efectelor cromozomiale ale virusurilor *herpes simplex* şi ale virusului bolii Marek.

a) *Virusul herpes simplex tip 1* are capacitatea de a induce aberaţii cromozomiale (lacune şi rupturi, rearanjamente) în culturile de celule de hamster chinez (31, 32, 54, 85), în celulele de rinichi de maimuţă (12, 101), în culturile de plămîni de embrioni umani (95), în liniile de celule umane HeLa şi Hep-2 (89) şi în culturile de leucocite periferice umane (89, 101, 111).

Există date care indică o specificitate a acţiunii virusului. În celulele de hamster chinez, cromozomii nr. 1 şi X sînt adesea sediul rupturilor (95). În leucocitele umane, rupturile sînt localizate de preferinţă în regiunile mediane ale unui cromozom D şi ale unui cromozom B, în regiunea mijlocie a braţului lung al unui cromozom C şi la nivelul braţului lung al unui cromozom nr. 2 (4, 49).

b) *Virusul herpes simplex tip 2* produce rupturi şi accentuarea constricţiilor secundare în cromozomii leucocitelor umane (78).

Se pare că anomaliile cromozomiale cauzate de virusul *herpes simplex* sînt independente de sinteza de ADN viral, ele fiind probabil rezultatul acţiunii unor enzime timpurii controlate de genomul viral (111).

c) Tumorile induse de *virusul bolii Marek* nu prezintă anomalii cromozomiale (11).

14.7. **Efectele virusurilor ARN**

14.7.1. Virusul sarcomului Rous

Virusul sarcomului Rous, izolat iniţial dintr-un sarcom de pui, avea o capacitate tumorigenă limitată la specia de origine. Ulterior au fost derivate linii de virus (inclusiv linia Schmidt-Ruppin) care au proprietatea de a produce tumori şi la rozătoare.

In vitro, virusul sarcomului Rous induce apariţia aberaţiilor cromozomiale (constînd mai ales în lacune şi rupturi, mai rar în rearanjamente) în culturile de fibroblaste de şobolan (74), în celulele de hamster chinez (42, 43) şi în culturile de leucocite umane (75).

Cercetările asupra tumorilor induse la gazda naturală — puiul de găină — sînt complicate de faptul că celulele acestei specii conţin un număr mare de microcromozomi. Într-un sarcom şi o eritroleucemie induse cu virus Rous la puii de găină, Ponten (80) a observat totuşi cariotipuri normale.

Scanned with OKEN Scanner

Datele referitoare la constituţia citogenetică a tumorilor induse de virusul Rous provin mai ales din cercetări efectuate asupra tumorilor induse la rozătoare.

Majoritatea tumorilor primare ale şoarecilor (50), şobolanilor (62) şi hamsterilor chinezi (43, 44) sînt alcătuite din celule diploide. Tumorile în care alături de linia principală diploidă există sublinii secundare anormale, tumorile pseudodiploide şi tumorile hiperdiploide sînt observate destul de frecvent. Hipodiploidia şi poliploidia au o importanţă redusă. Se pare că iniţial toate tumorile induse de virusul Rous sînt diploide. Ulterior au loc fenomene de progresiune cariotipică (52, 61, 64) care pot fi sistematizate astfel: a) apariţia unor celule variante heteroploide unice; b) dezvoltarea unor linii secundare din aceste celule; c) înlocuirea liniei principale diploide de către linia secundară; d) modificări ale liniei heteroploide, inclusiv ale nivelului ploidiei (de exemplu, trecerea de la un nivel diploid la unul tetraploid).

La şoarece, fenomenele de progresiune tumorală nu au putut fi studiate detaliat, deoarece cariotipul acestei specii este alcătuit din cromozomi cu o morfologie uniformă (52).

La hamsterul chinez, cea mai frecventă situaţie este reprezentată de apariţia hiperdiploidiei determinată de prezenţa unui cromozom adiţional aparţinînd perechii 5, 6 sau 10 (44).

Dezvoltarea heterodiploidiei la şobolani este anunţată de apariţia unui cromozom telocentric (t) suplimentar. Unele linii secundare prezintă, în plus, un cromozom suplimentar subtelocentric (st3). Aceste modificări cariotipice se instalează treptat, apariţia cromozomului suplimentar t precedînd apariţia cromozomului suplimentar st3 (62, 63).

Ipoteza apariţiei secvenţiale a modificărilor cariotipice a fost testată prin transplantarea seriată a două sarcoame alcătuite exclusiv din celule diploide, normale. În decursul transplantărilor, ambele tumori au prezentat o transformare heteroploidă, constînd în achiziţionarea succesivă a unor cromozomi suplimentari de tip t şi st3. În plus, a fost evidenţiată o a treia etapă, constînd în achiziţionarea unui cromozom suplimentar de tip st5 (63).

În diferitele părţi ale aceleiaşi tumori au fost observate, în general, modificări cromozomiale similare, demonstrînd originea clonală a tumorilor (50, 51, 62). În cîteva cazuri, în regiuni diferite ale aceleiaşi tumori au fost observate linii celulare deosebite, dar înrudite. Aceste deosebiri indică instalarea unui proces de evoluţie cromozomială şi nu sînt sugestive pentru o origine policlonală a tumorilor.

Constituţia citogenetică a celulelor este influenţată de particularităţile mediului în care se dezvoltă aceste celule. Astfel, în centrii

Scanned with OKEN Scanner

necrotici și hemoragici ai unor sarcoame de șobolani au fost observate celule în care 1–2 cromozomi metacentrici fuseseră pierduți. În mod similar, transferul unei tumori subcutanate în cavitatea peritoneală a determinat dezvoltarea unei ascite în care unul din cromozomii st5 era pierdut (61).

A fost evidențiată existența unei corelații între constituția cromozomială și aspectul histopatologic al tumorilor (51, 62). Fibrosarcoamele bine diferențiate prezintă linii susă diploide, fără linii celulare secundare. Odată cu apariția liniilor secundare anormale, tumorile iau aspectul unor sarcoame fuzocelulare. Sarcoamele anaplazice sînt constituite din linii susă heteroploide.

14.7.2. Virusurile complexului leucemie-sarcoame murine

Există destul de puține observații citogenetice asupra virusurilor murine. Rich și colab. (86) nu au remarcat prezența unor modificări cromozomiale în faza preleucemică a șoarecilor inoculați cu virusul leucemiei murine și au sugerat că anomaliile cromozomiale care apar în faza leucemică sînt o consecință a transformării neoplazice. Leucemiile transplantabile induse cu virus Moloney (38) și Friend (110) prezintă modificări citogenetice, cu constituirea unor clone anormale. În leucemiile induse cu virus Rauscher, Tsuchida și Rich (107) au observat anomalii cromozomiale variate, dar fără formarea unor clone individualizate.

Mori și Sasaki (67) au examinat 3 leucemii induse cu virus Friend la șobolani. Două cazuri au fost diploide; în al treilea caz predominau celulele cu 41 de cromozomi, care prezentau însă o instabilitate cariotipică pronunțată, neexistînd două celule cu un cariotip identic.

Limfoamele induse cu virus Rauscher la șobolani prezintă anomalii cromozomiale variate, iar examenul benzilor nu a relevat existența unei variante comune (67).

O parte din limfoamele induse cu virus Gross la șoareci (39) și șobolani (46, 67) sînt diploide. În cazurile care au prezentat anomalii cromozomiale nu au fost observate leziuni particulare.

Tumorile induse cu virusul sarcomului murin la șobolani (41) și hamsteri (40) prezintă aneuploidie și cromozomi markeri variați.

Datele prezentate sugerează că transformarea neoplazică indusă de virusuri se asociază uneori cu anomalii cromozomiale specifice. Ele ar putea rezulta fie din integrarea virusului în anumiți cromozomi, fie din afectarea preferențială a unor cromozomi și modifi-

Scanned with OKEN Scanner

carea consecutivă a echilibrului cromozomial. Posibilitatea ca aceste anomalii să intervină cauzal în carcinogeneză este testată în prezent în mai multe laboratoare.

BIBLIOGRAFIE

1. AARONSON S. A., TODARO G. J. — *Virology*, 1968, *36*, 254.
2. ALLISON A. C., PATON G. R. — *Nature (Lond.)*, 1965, *207*, 1 170.
3. AULA P., NICHOLS W. W. — *Exp. Cell Res.*, 1968, *51*, 595.
4. AYA T., MAKINO S., YAMADA M. — *Proc. Jap. Acad.*, 1964, *107*, 114.
5. BALTIMORE D. — *Nature (Lond.)*, 1970, *226*, 1 209.
6. BARSKI G., CORNFERT F. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1964, *107*, 114.
7. BAYREUTHER K. — *Nature (Lond.)*, 1960, *186*, 6.
8. BEY E. M., WHITCUTT J. M. — *S. Afr. J. Med. Sci.*, 1972, *37*, 33.
9. BEY E. M., WHITCUTT J. M. — *S. Afr. J. Med. Sci.*, 1972, *37*, 39.
10. BLACK P.H. — *Ann. Rev. Microbiol.*, 1968, *22*, 391.
11. BLOOM S. E. — *Avian Dis.*, 1970, *14*, 478.
12. BOIRON M., TANZER J., THOMAS M. — *Nature (Lond.)*, 1960, *209*, 737.
13. BORRELL A. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1903, *17*, 81.
14. BRAILOVSKY C., WICKER R., SUAREZ H., CASSINGENA R. — *Int. J. Cancer*, 1967, 2, 133.
15. BURDETTE W. J., YOON J. S. — *Science*, 1967, *155*, 340.
16. CASSINGENA R., TOURNIER P. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, *108*, 277.
17. CASTO B. C., DI PAOLO J. A. — Viruses, chemicals and cancer (manuscris).
18. COOPER H. L., BLACK P. H. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1963, *30*, 1 015.
19. COOPER H. L., BLACK P. H. — *J. cell. comp. Physiol.*, 1964, 64, 201.
20. COOPER J. E. K., YOHN D. S., STICH H. F. — *Exp. Cell Res.*, 1968, *53*, 225.
21. CROCE C. M., HUEBNER K., KOPROWSKI H. — *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1974, *71*, 4 116.
22. CROCE C. M., HUEBNER K., GIRARDI A. J., KOPROWSKI H. — *Virology*, 1974, *50*, 275.
23. DEFENDI V., LEHMAN J. M. — *J. cell. comp. Physiol.*, 1965, 66, 351.
24. DEFENDI V., LEHMAN J. M. — *Int. J. Cancer*, 1966, *1*, 525.
25. DUFF R., RAPP F. — *Nature New Biol.*, 1971, 233, 48.
26. ELLERMANN V., BANG O. — *Zbl. Bakt.*, 1908, 46, 595.
27. FERNANDES M. V., MOORDHEAD P. S. — *Texas Rep. Biol. Med.*, 1965, *23*, *suppl. 1*, 242.
28. FJELDE A., TRENTIN J. J., BRYAN E. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y)*, 1964, *116*, 1 102.
29. FORD D. K., BUGUSZEWSKI C., AUERSPERG N. — *J. Nat. Cancer Inst.* 1961, 26, 691.
30. GIRARDI A. J., WEINSTEIN D., MOORHEAD P. S. — *Ann. Med. exp. Biol. Fenn.*, 1966, *44*, 242.
31. HAMPAR B., ELLISON S. A. — *Nature (Lond.)*, 1961, *192*, 145.
32. HAMPAR B., ELLISON S. A. — *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1963, *49*, 474.

Scanned with OKEN Scanner

15. SEMNIFICAȚIA MODIFICĂRILOR CROMOZOMIALE ÎN CANCER

15.1. Introducere

În capitolele precedente am prezentat modificările cromozomiale observate în tumorile umane și în unele tumori experimentale. În cele ce urmează, vom încerca să precizăm rolul acestor modificări în inițierea și progresiunea stării de malignitate.

O primă întrebare de importanță fundamentală este următoarea: sînt modificările cromozomiale din celulele canceroase întîmplătoare sau se pot evidenția anumite modificări comune, definitorii pentru starea de malignitate? Această problemă poate fi abordată prin analiza globală a principalilor parametri care caracterizează din punct de vedere citogenetic tumorile: poziția numărului modal, distribuția cromozomilor în grupele sistemului Denver, prezența unor variante comune.

15.2. Analiza globală a modificărilor cromozomiale din tumori

15.2.1. Numărul modal în tumorile maligne

Transformarea malignă in vitro a celulelor de șoarece este însoțită de o modificare a numărului de cromozomi, care devine hipotetraploid. Hsu și colab. (52) au propus două modele care ar putea explica această evoluție cromozomială: conform primului model, secvența ar fi diploidie → tetraploidie → hipotetraploidie; conform celui de al doilea, evenimentele s-ar desfășura după secvența diploidie → hipodiploidie → hipotetraploidie. Prin analogie, Makino și colab. (75) au sugerat existența unui *număr modal optim pentru tumorile umane*, situat în regiunea hiperdiploidă-triploidă. Această ipoteză nu a fost însă confirmată de cercetările ulterioare, care au demonstrat că diferitele tumori, chiar cu aceeași localizare și cu un

Scanned with OKEN Scanner

aspect histologic similar, prezentau numere modale extrem de variate (124).

Majoritatea *tumorilor hipodiploide* prezintă cromozomi markeri lungi. Prezența lor explică conservarea materialului genetic din celule, reducerea cantității de ADN fiind minimă în comparație cu reducerea marcată a numărului de cromozomi.

În *tumorile hiperdiploide*, modificările cromozomiale sînt minore, constînd în prezența unor cromozomi suplimentari în unele grupe, combinată cu absența unor cromozomi din alte grupe. Nu se observă, de obicei, cromozomi markeri (8).

Tumorile cu numere modale triploide sau tetraploide prezintă modificări ale proporției cromozomilor normali din diferitele grupe, precum și cromozomi markeri de mărime mijlocie.

15.2.2. Analiza distribuției cromozomilor în grupele sistemului Denver

După cum am văzut, modificarea numărului de cromozomi din celule reprezintă un element important pentru caracterizarea stării de malignitate. Este însă aneuploidia însoțită de variația proporțională a cromozomilor din toate grupele sistemului Denver (A, B, C, D, E, F și G) sau anumite grupe sînt interesate în mod preferențial? Această problemă poate fi rezolvată comparînd raportul dintre numărul de cromozomi dintr-o anumită grupă și numărul total de cromozomi cu raportul existent într-o celulă normală. Dacă într-o celulă cu 92 de cromozomi a avut loc dublarea exactă a cromozomilor din toate grupele, atunci raportul dintre numărul de cromozomi din grupa A (12) și numărul total de cromozomi (92) este de 12/92, adică 0,1304, valoare identică cu cea observată într-o celulă normală (6/46=0,1304). Dacă însă o celulă tumorală cu 92 de cromozomi conține 10 cromozomi în grupa A, raportul devine 10/92=0,1087, valoare inferioară celei așteptate.

Levan (66) și Van Steenis (135) au aplicat această metodă pentru a analiza din punct de vedere statistic datele obținute de Ishihara și colab. (56) și Makino și colab. (75). Autorii au constatat un exces al cromozomilor din grupa C și o scădere relativă a cromozomilor din grupele D și G și au sugerat că translocațiile dintre cromozomii acrocentrici D și G ar putea da naștere unor elemente asemănătoare din punct de vedere morfologic cu cromozomii din grupa C. Întrucît cromozomii acrocentrici au rolul de organizatori nucleolari, consecința acestor translocații ar fi o pierdere sistematică și progresivă a organizatorilor nucleolari normali (94).

Scanned with OKEN Scanner

Utilizînd o metodă de analiză diferită, Sandberg şi colab. (125) nu au putut confirma ipoteza fuziunii centrice emisă de Levan şi Van Steenis, fiecare tumoare prezentînd o deviaţie particulară faţă de normal.

Minkler şi colab. (83) au analizat celulele tumorale utilizînd un ordinator care prelucra imaginile rezultate dintr-un baleiaj electronic şi au conchis că în celulele tumorale ar eixsta o „invariontă comună", reprezentată de excesul absolut sau relativ al cromozomilor E16. Materialul examinat de aceşti autori include însă linii celulare menţinute *in vitro*, multe dintre ele avînd o origine comună. Mai mult, acurateţea metodei de cariotipare utilizată în acest studiu nu a putut fi confirmată de către Bender şi colab. (16).

Atkin şi Baker (10) au constatat că în tumorile invazive există un deficit relativ al cromozomilor din grupele B, D şi G, în timp ce în leziunile preinvazive numărul cromozomilor din aceste grupe este apropiat de valorile aşteptate. Aceste date sugerează că distribuţia cromozomilor poate fi utilizată pentru a defini, cel puţin cu un anumit grad de probabilitate, etapa de transformare malignă care a fost atinsă.

Într-un studiu asupra carcinoamelor ovariene şi mamare (104, 115) am observat scăderea pronunţată a numărului de cromozomi din grupele A, B şi D şi creşterea relativă a numărului de cromozomi din grupa C. Întrucît pierderile de cromozomi din grupele A şi B sînt mai exprimate în grupa tumorilor care prezintă cromozomi markeri decît în grupa tumorilor fără cromozomi markeri, se poate presupune că rearanjamentele acestor cromozomi reprezintă originea cromozomilor markeri lungi, observaţi frecvent în tumorile ovariene şi mamare.

Căile prin care se poate ajunge la modificarea repartiţiei cromozomilor în grupe nu sînt precizate. O secvenţă posibilă este reprezentată de dublarea numărului de cromozomi din celule, urmată de pierderea preferenţială a cromozomilor din unele grupe (81). O altă modalitate ar consta în endoreduplicarea selectivă a cromozomilor din anumite grupe.

15.2.3. Evidenţierea unor variante comune

Termenul de „variantă comună" a fost propus de Lejeune (62) pentru a defini o anomalie specifică, structurală sau numerică, comună pentru toate tumorile de un anumit tip.

Scanned with OKEN Scanner

La om, singurul exemplu bine documentat de variantă comună este reprezentat de *cromozomul Ph¹ din leucemia granulocitară cronică*. Există și alte anomalii care, datorită frecvenței cu care apar, ridică problema unei posibile specificități. Majoritatea lor au fost discutate pe larg în capitolele precedente, astfel încît ne vom limita la o trecere în revistă a celor mai ilustrative exemple.

Ipoteza unui rol special al *cromozomilor din perechile 17–18 în proliferările neoplazice ale sistemului reticulo-endotelial* a fost emisă de Spiers și Baikie (133). Anomaliile acestor cromozomi, constînd în izocromozomi pentru brațul lung, monosomii și trisomii, deleții ale brațelor scurte sau lungi, au fost observate în leucemii granulocitare cronice și acute, leucemii limfocitare cronice, limfoame gigantofoliculare, limfosarcoame și reticulosarcoame, boala Hodgkin. Din grupa modificărilor cromozomilor 17–18 se detașează, prin frecvența sa, anomalia i(17q) (izocromozom pentru brațul lung al unui cromozom nr. 17), a cărei identitate a fost stabilită cu ajutorul tehnicilor de bandare (35).

Rowley (122) a analizat recent cazurile de *afecțiuni hematologice* studiate cu ajutorul tehnicilor de bandare și a constatat *afectarea preferențială a cromozomilor nr. 7, 8 și 9*. Cea mai comună anomalie este reprezentată de trisomia cromozomilor nr. 8. Trisomia cromozomilor nr. 9 este ceva mai puțin frecventă. Unul din cromozomii perechii 7 este adesea pierdut. Cariotipuri identice (adică +8, +9, –7) au fost observate atît în leucemiile acute și în perioadele de acutizare ale leucemiilor granulocitare cronice, cît și în unele afecțiuni neleucemice care prezintă un potențial crescut de transformare leucemică (anemii refractare, neutropenii).

Recent, a fost descris un nou sindrom hematologic cu un cariotip distinct: *deleția brațului lung al unui cromozom nr. 5 (5q–)* (132). Examenul sîngelui relevă prezența unei anemii macrocitare severe, cu ușoară leucopenie și valori normale sau crescute ale trombocitelor. În măduva osoasă se constată o depresie a seriei eritrocitare și unele anomalii ale seriei granulocitare, cu o creștere ocazională a mieloblaștilor.

În *afecțiunile sistemului limfatic apar adesea anomalii ale cromozomilor nr. 14*. Ele au fost observate la bolnavii cu limfom Burkitt (76), limfosarcom (121), mielom multiplu (139) și ataxie-telean-giectazie (108).

Problema specificității cromozomilor markeri din *afecțiunile imunoproliferative maligne paraproteinemice* a fost discutată recent de Moraru și Diculescu (32, 92), care au sugerat existența unui cromozom marker comun, denumit CD (denominator comun).

Scanned with OKEN Scanner

Din cauza dificultăților tehnice, există mai puține date asupra tumorilor umane solide. Absența unui cromozom nr. 22 în *meningioame* este în prezent bine documentată (77). Prezența unui cromozom marker lung, prezentînd adesea o constricție secundară, a fost semnalată în *tumorile testiculare (79)*, dar identitatea sa nu a fost încă stabilită cu ajutorul benzilor. În *carcinoamele corpului uterin* există adesea trisomii ale cromozomilor din grupa C (5), în timp ce în *polipii colonului* se observă cromozomi suplimentari în grupa C și pierderea unor cromozomi din grupa D (78).

Alte exemple de variante comune sînt oferite de *studiul tumorilor spontane și experimentale ale animalelor*. Dintre neoplaziile spontane, *tumoarea Sticker* ocupă o situație specială. Această tumoare a cîinilor, cu o structură histologică sarcomatoasă, se transmite prin contact sexual, localizarea sa fiind de obicei limitată la organele genitale externe. Aria geografică de răspîndire este extrem de largă, iar frecvența cu care este întîlnită pare destul de mare. Cercetări efectuate în țări diferite (Japonia, S.U.A., Franța, Jamaica) au demonstrat, în mod neașteptat, că tumorile aveau o constituție citogenetică similară: 59 de cromozomi, dintre care 17 metacentrici sau submetacentrici și 42 acrocentrici (74). Sarcomul Sticker nu pare a avea o etiologie virală, deoarece în tumori nu au fost evidențiate particule de tip virusal, iar tumorile nu pot fi transmise cu filtrate acelulare sau cu celule înghețate, încălzite sau desicate, ci numai cu celule vii. Cea mai plauzibilă explicație a cariotipului universal al acestor tumori este o „contagiune celulară" realizată în timpul contactului sexual.

În *leucemia spontană a șoarecilor AKR*, Dofuku și colab. (33) au evidențiat a trisomie a cromozomilor nr. 15.

În *leucemiile și sarcoamele induse cu dimetilbenzantracen la șobolani, cromozomii* perechii nr. 2 sînt afectați preferențial. În unele cazuri se observă trisomii complete ale acestor cromozomi; alteori, segmente din cromozomii nr. 2 sînt incluse în constituția unor cromozomi markeri (68). *Sarcoamele induse prin inocularea virusului Rous* prezintă un tablou citogenetic complet diferit, anomalia cea mai frecventă constînd în trisomia unui cromozom telocentric de mărime mijlocie (85).

În *sarcoamele produse cu dimetilbenzantracen la hamsterii chinezi* se observă prezența unui cromozom adițional în perechea nr. 11. *Sarcoamele induse cu virusul sarcomului Rous* la hamsterii chinezi din aceeași linie se caracterizează prin trisomia uneia din perechile 5, 6 sau 10 (85).

Problema existenței variantelor comune în tumori nu este încă rezolvată. Aplicarea tehnicilor de bandare a demonstrat că unii cro-

Scanned with OKEN Scanner

mozomi cu un aspect morfologic normal erau, în realitate, rezultatul unor rearanjamente structurale variate (45, 48, 102, 106). Pare de aceea probabil ca anomalii cromozomiale specifice să fie mascate de numărul mare de modificări nespecifice, supraadăugate, care conferă cariotipului un aspect extrem de complex și polimorf.

15.3. **Originea clonală a tumorilor**

În contrast cu variabilitatea observată de la o tumoare la alta, *cariotipurile provenite din aceeași tumoare prezintă o omogenitate remarcabilă* (5). Cariotipurile sînt fie identice, fie similare, deosebindu-se numai prin variații limitate ale numărului de cromozomi (9). Prezența unor cromozomi markeri comuni stabilește relația clonală dintre celule și permite concluzia că tumorile rezultă din multiplicarea unor celule anormale unice.

Unele tumori prezintă mai multe linii celulare, avînd niveluri diferite de ploidie. Analiza cariotipică a demonstrat filiația dintre aceste linii. Celulele cu valori ridicate ale numărului de cromozomi prezintă un număr dublu de cromozomi markeri și rezultă din poliploidizarea celulelor cu valori mai mici ale numărului de cromozomi (2, 99).

Celulele provenite din regiuni diferite ale aceleiași tumori prezintă, în general, cariotipuri asemănătoare. Excepțiile, în care regiunile diferite ale aceleiași tumori sînt alcătuite din celule cu cariotipuri diferite, pot fi explicate prin fuziunea mai multor tumori care au luat naștere în mod independent (8). Astfel, un carcinom al cecului prezenta cariotipuri diferite, avînd 41–42 și, respectiv, 68 de cromozomi în regiuni cu aspecte histologice diferite (5). Un alt exemplu este reprezentat de un carcinom ovarian în care două regiuni ale tumorii primare au prezentat cariotipuri diferite, un cromozom marker lung fiind prezent într-o regiune, dar nu și în cealaltă (8).

În unele situații, au fost identificate clone de celule anormale încă din *stadiile premaligne*. Exemple bine documentate sînt reprezentate de displaziile colului uterin (134), polipii intestinului gros (8), meningioame (77), tumorile filode mamare (107) și chistadenoamele ovariene (42).

Originea clonală a *leucemiilor acute și cronice* a fost demonstrată în numeroase lucrări, unele dintre ele efectuate cu ajutorul tehnicilor de bandare. Leucemia granulocitară cronică ocupă o poziție specială, datorită prezenței cromozomului Philadelphia în toate celulele leucemice. Prezența de celule cu anomalii cromozomiale a fost evidențiată și în unele cazuri de sindroame mieloproliferative și insufi-

Scanned with OKEN Scanner

cienţe medulare. S-a sugerat că bolnavii care prezintă asemenea modificări sînt mai expuşi la riscul de transformare leucemică decît pacienţii care prezintă cariotipuri normale (97).

Determinările microspectrofotometrice ale conţinutului de ADN din nuclei au adus date care confirmă ipoteza originii clonale a neoplaziilor. Nucleii tumorilor maligne conţin cantităţi aneuploide de ADN care se grupează de obicei în jurul unei anumite valori, denumită valoare modală sau „modul" tumorii (4, 14). Variaţia perimodală a valorilor ADN din nuclei este limitată (3), situaţie analoagă cu variabilitatea redusă a cariotipurilor în comparaţie cu cariotipul standard al majorităţii celulelor dintr-o tumoare.

În unele displazii apar clone de celule cu un conţinut aneuploid de ADN, confirmînd faptul că displazia este o entitate histopatologică ce face tranziţia între epiteliul cervical normal şi carcinomul intraepitelial (20, 123). Prezenţa aneuploidiei a fost observată şi în unele chistadenoame ovariene (111), precum şi în afecţiunile precanceroase ale pielii (34).

Problema originii unicelulare sau multicelulare a cancerului poate fi abordată şi prin *studiul biochimic* al tumorilor care iau naştere la indivizii constituiţi din două sau mai multe tipuri de celule a căror expresie fenotipică este diferită (mozaicism) (36, 43). O astfel de situaţie poate fi întîlnită la femei, datorită inactivării unuia din cromozomii X. Această inactivare, care are loc în stadiul de dezvoltare embrionară, interesează în unele celule cromozomul X de origine maternă, iar în alte celule, cromozomul X de origine paternă. Inactivarea odată realizată este stabilă, manifestîndu-se şi la descendentele celulei, care formează o clonă cu caracteristici identice cu ale celulei de origine. Acest tip de inactivare a fost demonstrat pentru mai multe enzime ale căror gene sînt situate pe cromozomul X, inclusiv glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-PD). Sistemul G-6-PD prezintă mai multe alele, dintre care patru (GdB, GdB$^-$, GdA, GdA$^-$) sînt mai frecvente. Variantele enzimatice sintetizate pot fi recunoscute pe baza comportamentului lor electroforetic. În ţesuturile femeilor heterozigote (GdA/GdB), care au două tipuri de celule – unele care sintetizează produsul A, altele care sintetizează produsul B – sînt prezente, în proporţii egale, ambele tipuri de enzime. Dacă o tumoare ar lua naştere dintr-o singură celulă, examenul electroforetic ar trebui să evidenţieze prezenţa unei singure enzime. Tumorile cu origine multicelulară ar trebui să conţină ambele tipuri de enzime.

Aplicarea acestei metode a demonstrat că majoritatea neoplaziilor – leiomioame (70, 136), displazii şi carcinoame cervicale (109.

Scanned with OKEN Scanner

131), teratoame ovariene (69), melanoame (37), neuroblastoame (37), limfoame Burkitt (37, 39) și leucemii granulocitare cronice (38) — au o origine unicelulară. Tumorile ereditare examinate — trichoepitelio-mul (44) și neurofibromatoza multiplă (40) — au prezentat însă o compoziție enzimatică mozaicată, indicînd că tumorile erau constituite din două tipuri diferite de celule.

Aceste date pot fi corelate cu ipoteza lui Knudson și Strong (60), care presupune că tumorile sînt rezultatul unor evenimente mutaționale secvențiale. În cazul tumorilor neereditare, probabilitatea ca două sau mai multe mutații să survină în cîteva celule adiacente este extrem de mică, ceea ce explică originea unicelulară a acestor tumori. Persoanele predispuse la anumite forme ereditare de cancer prezintă o susceptibilitate inițială în toate celulele, oferind astfel o țintă mare evenimentului inițiator al proliferării neoplazice (43).

Astfel, date obținute cu ajutorul unor metode diferite de investigație demonstrează că tumorile sînt, cu rare excepții, constituite din clone de celule derivate dintr-o celulă malignă unică. Omogenitatea cariotipurilor dintr-o anumită tumoare, precum și faptul că deviațiile cromozomiale observate în unele tumori experimentale sînt deosebit de constante, de-a lungul multor generații de transplant, au condus la formularea ipotezei *„linie susă"*. Conform acestei ipoteze, emisă de Makino (73) în anul 1952, propagarea tumorilor este datorită proliferării unui anumit tip de celulă, care prezintă de obicei anomalii cromozomiale numerice sau structurale. Linia susă tumorală tinde să rămînă stabilă în cazul unor condiții constante ale mediului. Pe de altă parte, ea dă naștere, în mod continuu, unor celule variante care, în anumite situații, pot ajunge să predomine tabloul citogenetic, datorită unor proprietăți adaptative superioare (fenomenul de evoluție clonală).

15.4. **Evoluția clonală în tumori**

Progresiunea tumorilor este consecința unui proces microevoluționar, caracterizat prin apariția unor celule variante, cu o complexitate cariotipică crescîndă. Astfel, între celulele normale și celulele tumorale complet remaniate se interpun o serie de etape intermediare, marcate de apariția succesivă a unor anomalii.

Mecanismele care stau la baza evoluției clonale sînt reprezentate de erori ale mecanicii cromozomiale. Duplicarea unui cromozom poate fi consecința unei nondisjuncții sau a unei endoreduplicări

Scanned with OKEN Scanner

selective (65). În primul caz, apar două celule reciproce: una trisomică pentru cromozomul în cauză, alta monosomică. Endoreduplicarea selectivă, definită ca o replicare dublă a unei părți din genom, determină trisomii totale sau parțiale, după cum interesează un cromozom întreg sau un segment de cromozom.

O altă modalitate de evoluție clonală a cariotipului este reprezentată de dublarea numărului de cromozomi prin endoreduplicare sau endomitoză, rezultînd celule tetraploide. Aceste celule suferă apoi o evoluție regresivă, cu pierderea anumitor cromozomi în decursul anafazei (cromozomi retardatari). Mitozele tri- sau multipolare reprezintă o altă cauză de repartizare inegală a cromozomilor.

În sfîrșit, existența unor anomalii cromozomiale pare să favorizeze apariția unor noi aberații, datorită unui *„efect intercromozomic"* (65).

Totuși, deși erorile de mecanică cromozomială furnizează fără încetare variante cromozomiale noi, fiecare tumoare se caracterizează printr-un cariotip majoritar propriu. Aceasta presupune o eliminare continuă a tipurilor celulare mai puțin eficiente și emergența ocazională a unor tipuri mai bine adaptate. Se ajunge astfel la noțiunea de *valoare selectivă a cariotipului*, fundamentată de Ford și colab. (41). Factorii restrictivi pot fi intra- sau extracelulari. *Legea „combinațiilor interzise"* a lui Lejeune (64) se referă la intervenția factorilor metabolici. Întrucît metabolismul celular constă dintr-o suită de reacții care se desfășoară într-o ordine precisă, anomaliile cromozomiale nu se pot acumula la întîmplare, ci trebuie să se succeadă într-o ordine impusă de modificările metabolice pe care le antrenează.

Un alt factor care controlează „combinațiile interzise" este reprezentat de *sistemul imunologic*, care nu permite supraviețuirea unor clone de celule dotate cu caractere antigenice care fac posibilă recunoașterea și rejectarea lor de către organism (46). În aceste condiții are loc selecția celulelor mai puțin antigenice. Astfel, injectarea celulelor Ehrlich hiperdiploide la șoareci în prealabil imunizați a determinat selectarea unor linii ascitice poliploide (58).

Faptul că tumorile sînt rezultatul final al unui proces complicat de evoluție clonală are implicații importante pentru *terapie*. Individualitatea genetică pronunțată a tumorilor, chiar cu aceeași localizare și cu aspecte histologice similare, explică și susceptibilitatea lor diferită față de acțiunea agenților chimioterapeutici (97). Mai mult, datorită instabilității cariotipice, se generează continuu variante celulare chimiorezistente sau cu antigenicitate modificată, care fac ineficiente metodele actuale de chimioterapie sau imunoterapie.

Scanned with OKEN Scanner

15.5. **Constituția citogenetică a tumorilor primitive și a metastazelor lor**

O altă problemă care poate fi rezolvată cu ajutorul analizei cromozomiale este aceea a relației dintre populația celulară a tumorilor primitive și a metastazelor lor.

Rabotti (120), care a utilizat o tehnică microspectrofotometrică de determinare a conținutului în ADN din celulele tumorilor mamare umane și a metastazelor lor, a observat că în metastaze are loc o acumulare a celulelor poliploide. Chu și Malmgren (24) au obținut rezultate asemănătoare prin studiul unor tumori spontane și transplantate ale șoarecilor. Pe baza acestor date s-a emis ipoteza citogenetică a fenomenului de metastazare. O primă posibilitate ar fi ca toate tipurile de celule să fie eliberate din tumori și să circule în sistemul vascular și limfatic, dar numai cîteva să participe la constituirea focarelor metastatice. O altă interpretare presupune că numai celulele heteroploide se desprind din tumori și au posibilitatea de a forma emboli tumorali (116).

Cercetări ulterioare asupra carcinoamelor gastrice (53, 54), ovariene (130), mamare (80) și intestinale (8) au demonstrat însă că în majoritatea cazurilor există o identitate între nivelul ploidiei (estimat prin determinări microspectrofotometrice) și constituția citogenetică a tumorilor primitive și a metastazelor. Cazurile în care se înregistrează diferențe între tumorile primitive și metastaze par a fi destul de rare (26). În aceste situații, nivelul ploidiei din metastaze poate fi mai ridicat (15) sau mai scăzut decît în tumorile de origine (71, 72).

Cercetările experimentale asupra carcinomului Walker 256 (22, 95), hepatoamelor ascitice AH-130 și AH-13 (55), hepatomului ascitic Seidel (59) și tumorii T8 (137) au demonstrat existența aceleiași similitudini între constituția citogenetică a tumorilor primitive și a metastazelor (fig. 56, 57). În unele cazuri, proprietățile celulelor metastatice (de exemplu, susceptibilitatea la acțiunea agenților chimioterapeutici) sînt deosebite de ale celulelor din tumorile primitive (1).

Situațiile în care se observă deosebiri evidente între tumoarea primitivă și metastazele ei sînt mai greu de explicat, dar datele experimentale sugerează intervenția posibilă a trei factori. Un prim factor ar putea fi reprezentat de afinitatea diferită a celulelor diploide și poliploide pentru anumite organe. Astfel, celulele poliploide ale sarcomului Yoshida prezintă o afinitate crescută pentru splină, rinichi și plămîni, în timp ce celulele diploide metastazează de preferință în timus și ganglionii limfatici (142).

Scanned with OKEN Scanner

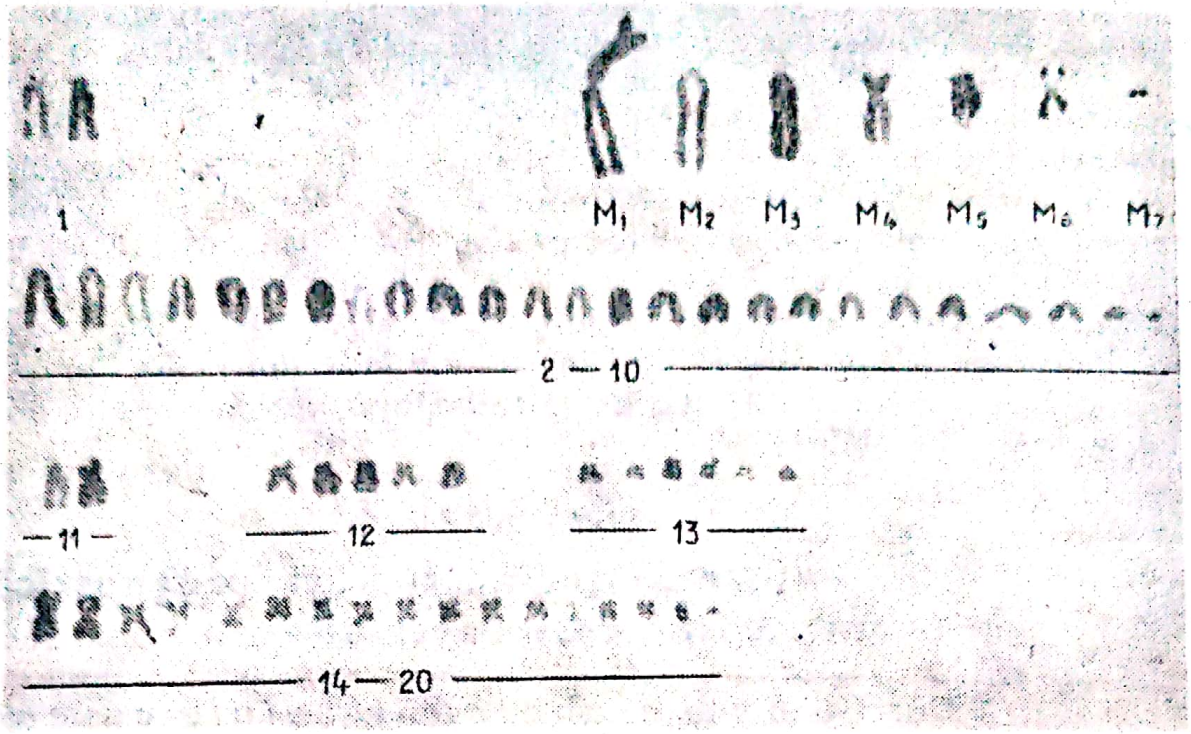


Fig. 56 — Cariotipul unei celule dintr-o tumoare Walker.

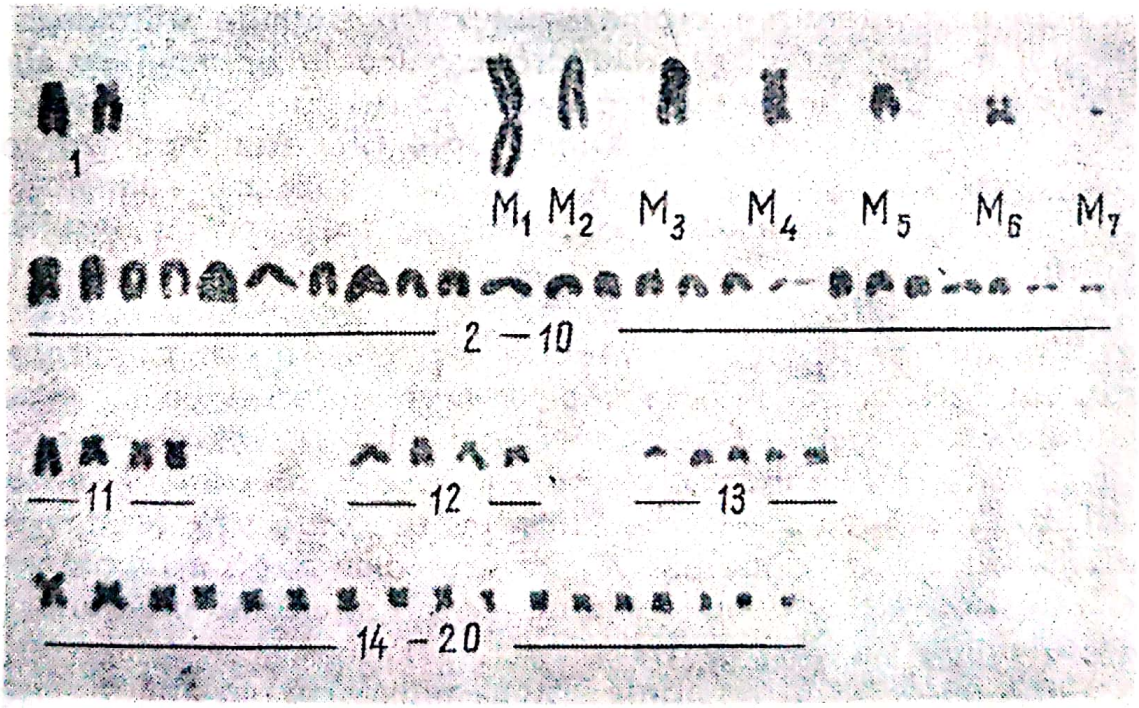


Fig. 57 — Cariotipul unei celule din metastaza limfoganglionară a unei tumori Walker.

Scanned with OKEN Scanner

Intervenţia unui al doilea factor este sugerată de experienţele lui Mitelman (84, 89) asupra sarcoamelor induse cu virus Rous la şobolani. Aproximativ 1/3 din sarcoamele primare cu linii susă diploide prezentau şi linii secundare cu anomalii cromozomiale, în timp ce asemenea linii secundare au fost observate în 2/3 din metastaze. Se pare astfel că progresiunea tumorală este accelerată în metastazele limfoganglionare, acest factor contribuind la conturarea unor diferenţe între tumorile primitive şi metastazele lor.

Metastazarea nu este însă condiţionată numai de calităţile celulelor tumorale, ci depinde şi de starea organismului (127), iar sistemul imunologic are capacitatea de a selecţiona, după cum am văzut, anumite variante celulare.

15.6. **Valoarea diagnostică şi prognostică a examinărilor cromozomiale**

Întrucît prezenţa *clonelor de celule cu modificări cromozomiale* reprezintă o trăsătură caracteristică a proceselor neoplazice, s-a sugerat posibilitatea de a utiliza studiile citogenetice ca un criteriu suplimentar de afirmare a malignităţii în cazurile în care rezultatele examinărilor clinice şi anatomo-patologice nu sînt concludente. Un domeniu în care cercetările cromozomiale îşi pot găsi o largă aplicabilitate este reprezentat de *afecţiunile hematologice*. Evidenţierea cromozomului Ph^1 permite afirmarea diagnosticului de leucemie granulocitară cronică la bolnavii cu simptomatologie clinică şi hematologică necaracteristică (100). Apariţia unor clone de celule cu anomalii cromozomiale (97) sau modificarea aspectului cromozomilor care devin estompaţi, imprecis delimitaţi (61), indică iminenţa transformării leucemice a cazurilor de insuficienţă medulară.

Valoarea modificărilor cromozomiale în *diagnosticul exsudatelor maligne* a fost demonstrată în două articole recent publicate (82, 105). În studiul nostru (105), bazat pe examinarea a 53 de exsudate provenite de la pacienţi cu cancer, am utilizat următoarele criterii pentru a defini malignitatea citogenetică: a) prezenţa cromozomilor markeri; b) prezenţa unor linii celulare aneuploide sau pseudoploide; c) cazurile cu celule hipodiploide, în care distribuţia cromozomilor în grupe este anormală, astfel încît nu se poate pune problema unor artefacte tehnice (celule „sparte").

În seria noastră, examinările citogenetice au confirmat malignitatea în 40 de cazuri diagnosticate ca pozitive la examenul citologic. În 2 cazuri, considerate citologic „suspecte", şi în 3 cazuri, conside-

Scanned with OKEN Scanner

rate „negative", au fost evidențiate modificări cromozomiale caracteristice pentru malignitate. Întrucît corectitudinea examenului citogenetic a fost verificată de examinările anatomo-patologice sau necropsice ulterioare, credem că evidențierea unor date cromozomiale pozitive permite afirmarea cu certitudine a malignității.

Diagnosticul citogenetic de benignitate a corespuns în 3 cazuri cu rezultatele examinărilor citologice. În alte 3 cazuri în care au fost observate numai metafaze diploide, examenul citologic a demonstrat prezența unor celule maligne. Originea metafazelor diploide din exsudatele maligne nu este încă precizată. În unele cazuri, ele ar putea deriva din celule reactive (celule mezoteliale, histiocite, limfocite). Este însă posibil ca cel puțin unele celule diploide să fie celule tumorale. Din acest punct de vedere, este interesant de semnalat faptul că două din cele trei cazuri de diagnostice fals negative au fost datorite unor carcinoame ovariene. Într-un studiu asupra carcinoamelor ovariene, Atkin și colab. (12) au descris de asemenea o tumoare care conținea o proporție mare de celule diploide. Întrucît examenul histologic al secțiunilor a relevat un număr mic de mitoze în celulele stromale, s-a sugerat că metafazele diploide derivau din celule tumorale. Celălalt diagnostic fals-negativ a fost făcut într-un caz de boală Hodgkin. Miles și Wolinska (82) au subliniat de asemenea frecvența mare a cazurilor diploide la pacienții cu limfoame maligne. Unele metafaze diploide observate în boala Hodgkin ar putea proveni din limfocite tumorale (98). Oricare ar fi explicația, posibilitatea unor diagnostice fals-negative trebuie reținută.

Întrucît nici la examenul citologic, nici la examenul citogenetic nu au fost făcute diagnostice fals-pozitive, credem că cele două metode sînt complementare. Dacă în seria noastră de exsudate, examenul citologic a relevat 43 de cazuri pozitive, 4 suspecte și 6 negative, combinarea datelor citologice cu cele citogenetice se exprimă în 49 de cazuri pozitive și 3 cazuri negative. Un caz, care a rămas „suspect", a avut o evoluție malignă. Aceste date justifică introducerea examinărilor cromozomiale în diagnosticul exsudatelor.

Prezența unor cromozomi markeri de dimensiuni mari poate fi recunoscută și pe *secțiunile histologice sau pe frotiurile executate de rutină*, sub forma unor proeminențe care ies din conturul celulelor în diviziune (13, 21) (fig. 58). Evidențierea unor asemenea anomalii are valoare diagnostică și prognostică, dovedind malignitatea citogenetică a unor tumori cu aspect histologic benign sau incert.

Problema *cromatinei sexuale în tumori* a fost discutată în detaliu. Reamintim numai faptul că între incidența cromatinei sexuale și gradul de diferențiere cito-histologică a tumorilor există o

Scanned with OKEN Scanner

corelație strînsă. Pacientele cu tumori mamare sex-cromatino-negative au un prognostic mai nefavorabil decît pacientele cu tumori sex-cromatino-pozitive (23).

Determinarea *cantității de ADN din nucleii tumorali* are o importanță deosebită pentru estimarea prognosticului.

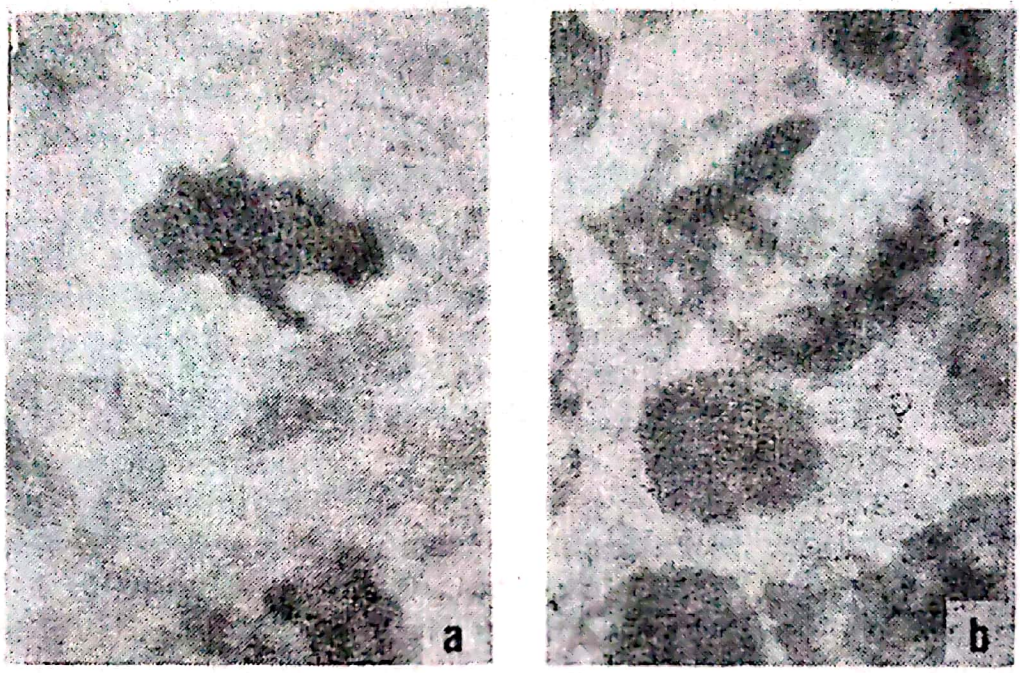


Fig. 58 — Proeminențe care ies din conturul unei metafaze (*a*) și al unei ana-telofaze (*b*), determinate de prezența unor cromozomi markeri lungi.

Pacientele cu tumori mamare (7) și ovariene (6) diploide au un prognostic mai bun decît pacientele cu tumori tetraploide. Hiperplaziile chistice ale glandei mamare cu valori aneuploide ale ADN nuclear sînt mai expuse la transformarea malignă decît tumorile cu un aspect histopatologic similar, dar cu un conținut normal de ADN (57). Cercetările efectuate asupra feocromocitoamelor au dus la rezultate asemănătoare: tumorile benigne cu valori diploide ale ADN s-au limitat la o creștere locală; tumorile cu un aspect histologic similar, dar care au avut valori hiperdiploide sau peritriploide ale ADN, au metastazat.

15.7. **Cromozomii și inițierea malignității**

Problema rolului modificărilor cromozomiale în inițierea stării de malignitate este extrem de disputată. Aflat în fața unor date contradictorii, a căror semnificație este adesea incertă, citogeneticia-

Scanned with OKEN Scanner

nul este în situaţia moştenitorului descris de Pascal, care a găsit actele casei sale (64): poate oare neglija examinarea acestor documente gîndindu-se că ele ar putea fi false?

15.7.1. Ipoteza echilibrului cromozomial

Celulele *transformate în vitro* sub acţiunea agenţilor cancerigeni chimici sau virali dobîndesc anumite proprietăţi care le deosebesc de celulele normale din care derivă: lipsa inhibiţiei de contact a replicării celulare, eficienţă crescută de clonare în mediu lichid, capacitatea de a forma colonii în agar moale, proprietatea de a forma tumori în urma injectării *in vivo*.

Proprietăţile caracteristice transformării pot fi din nou *supresate*. Celulele transformate produc variante în care malignitatea este pierdută, fenomen care a fost denumit *reversie*. Aceste variante pot fi selectate prin cultivarea celulelor transformate pe un strat de celule normale fixate în prealabil cu glutaraldehidă (116) sau prin tratament cu 5-fluorodezoxiuridină (FUDR) (111) sau 5-bromodezoxiuridină (BUDR) (128).

Cîteva exemple vor preciza *principalele aspecte ale fenomenului de reversie a malignităţii:*

a) Rabinowitz şi Sachs (116) au cultivat celule de hamster sirian transformate cu virus polyoma pe monostraturi de celule normale fixate cu glutaraldehidă. Coloniile formate în aceste condiţii erau alcătuite din celule plate, epitelioide, contrastînd cu forma fibroblastică, elongată, a celulelor originale transformate. Densitatea de saturaţie era mult scăzută, iar celulele prezentau fenomenul de inhibiţie de contact. Eficienţa de clonare în mediu lichid şi în agar moale a fost redusă, iar coloniile formate în agar moale erau mai mici decît cele formate de celulele parentale. Tumorigenicitatea celulelor era mult redusă. Astfel, în timp ce celulele parentale formau tumori după inocularea a 1×10^3 celule, celulele variante nu au indus tumori nici după inocularea a 1×10^5 celule. Inocularea a 1×10^6 celule variante a determinat apariţia tumorilor, dar ritmul lor de creştere era mult mai redus decît al tumorilor rezultate din inocularea celulelor parentale.

b) Tumorigenicitatea celulelor de melanom murin B16 este pierdută în urma tratamentului *in vitro* cu BUDR (128). Concomitent, celulele melanotice îşi pierd capacitatea de a elabora pigment.

c) Pollack şi colab. (111) au obţinut variante cu o malignitate redusă prin tratarea cu FUDR a unor linii celulare transformate cu virus polyoma şi cu SV40. Clonele variante au continuat să prezinte antige-

Scanned with OKEN Scanner

nul T polyoma și respectiv T SV40, caracteristic celulelor parentale. Reversia a avut deci loc în condițiile persistenței genomului viral (sau cel puțin a unei părți din genomul viral) în celule. Determinările precise efectuate de Shani și colab. (126) au demonstrat că celulele revertante derivate din celule transformate cu virus polyoma conțin același număr de copii de ADN virusal ca și celulele parentale, iar ADN-ul virusal continuă să fie asociat cu ADN-ul celular.

d) Antigenicitatea celulelor variante este adesea modificată. Rabinowitz și Sachs (117) au remarcat o pierdere a antigenelor de transplantare în celulele revertante provenite dintr-o linie transformată *in vitro* cu virus polyoma. Mondal și colab. (91) au izolat clone cu o malignitate redusă dintr-o linie de fibroblaste de șoarece transformate *in vitro* cu metilcolantren. Celulele variante și-au pierdut antigenele de suprafață caracteristice pentru celulele parentale maligne. Rezultate oarecum diferite au fost obținute de Silagi și colab. (129), care au observat că celulele melanomului B16 tratate *in vitro* cu BUDR prezintă antigenul de suprafață Gross, nedetectabil în celulele martore și au o expresie crescută a antigenului H-2^{b}. Celulele tratate, injectate unor șoareci adulți, nu formează tumori, dar au capacitatea de a proteja animalele față de inocularea celulelor de melanom netratate. Este astfel posibil ca modificarea antigenicității să contribuie la modelarea tumorigenicității celulelor revertante.

e) Starea de reversie nu este stabilă, iar celulele revertante dau naștere unor celule segregante în care proprietățile maligne sînt reexprimate (re-reversie) (51, 119).

Cercetările inițiale asupra *constituției cromozomiale a celulelor revertante* au arătat că reversia este însoțită de o creștere a numărului de cromozomi (19, 96, 112, 113, 118). Pe această bază s-a conchis că poliploidizarea reprezintă o componentă necesară a mecanismului de inducere și de menținere a stării de reversie. Investigațiile ulterioare au demonstrat însă că celulele revertante pot prezenta fie o creștere, fie o scădere a numărului de cromozomi (49, 91, 103).

Primul *model de control genetic al malignității* a fost expus de Rabinowitz și Sachs în anul 1970 (118). Conform acestui model, transformarea malignă și reversia sa sînt controlate de echilibrul dintre genele pentru expresia (E) și supresia (S) malignității. Aceste gene pot fi localizate pe cromozomi diferiți, iar malignitatea este indusă fie printr-o creștere a factorilor E, fie printr-o scădere a factorilor S. Factorii E ar exista și în celulele normale, unde sînt însă neutralizați de factorii S. Carcinogenii ar induce malignitatea producînd anomalii cromozomiale care determină o modificare a echilibrului dintre E și S. Reversia la un control normal al creșterii se poate realiza fără revenirea la

Scanned with OKEN Scanner

un cariotip normal, cu condiția ca celulele revertante să conțină suficienți factori S.

Întrucît în celulele de hamster transformate cu virus polyoma (49) și cu dimetilnitrozamină (50) a fost observată o creștere a numărului de cromozomi din grupa 5, iar reversia s-a corelat cu o scădere a proporției cromozomilor din această grupă, s-a presupus că factorii necesari pentru expresia malignității sînt localizați pe cromozomii din grupa 5.

În celulele variante crește numărul de cromozomi din grupele 6 și 7, iar restaurarea tumorigenicității acestor celule (re-reversia) se asociază cu o pierdere a acestor cromozomi. Factorii supresori ai malignității ar fi deci localizați pe cromozomii din grupele 6 și 7.

Aceste cercetări au fost extinse prin utilizarea tehnicilor de bandare. S-a precizat că în cazul celulelor transformate cu virus polyoma, genele pentru expresia malignității sînt localizate pe cromozomul 5_6, iar genele pentru supresie sînt localizate pe cromozomii 5_3 și 7_2 (140). În cazul celulelor transformate cu dimetilnitrozamină, factorii pentru expresie ar fi localizați pe cromozomii 5_7 și 5_{10}; factorii supresori ai transformării sînt localizați pe cromozomul 7_3, iar factorii supresori ai malignității, pe cromozomul 7_2 (141). Benedict și colab. (17) au transformat celule de hamster cu 1-D-arabinofuranozilcitozină și cu dimetilnitrozamină. Clonele în care exista o predominanță a cromozomilor 5_7 asupra cromozomilor 7_3 prezentau o malignitate înaltă. Clonele în care numărul de cromozomi 5_7 era egal cu numărul de cromozomi 7_3 sau în care cromozomii 7_3 erau în exces, aveau o malignitate joasă.

Studiile referitoare la reversia malignității și la substratul ei cromozomial au pus în discuție, fără îndoială, o problemă extrem de interesantă. *Pare însă prematur ca pe baza acestor date să se construiască o teorie generală a carcinogenezei*, din următoarele motive:

a) Reversia nu înseamnă o transformare a unei celule canceroase într-o celulă normală, ci o supresie temporară a anumitor proprietăți ale malignității. Reducerea tumorigenicității are loc fără revenirea la un genom diploid, iar intervenția unor factori epigenetici nu poate fi exclusă. În experiențele lui Silagi și Bruce (128), tumorigenicitatea celulelor de melanom de șoarece era redusă sau pierdută în urma tratamentului cu BUDR; efectele erau însă reversibile după cultivarea în mediu normal și puteau fi prevenite prin adăugarea unei cantități echimolare de timidină în mediu. Aceste fenomene pot fi explicate prin intervenția BUDR asupra mecanismelor de reglare celulară și nu implică în mod necesar mutații la nivel genic sau cromozomial.

b) Codish și Paul (25) au examinat un fibrosarcom de șoarece indus cu metilcolantren, evidențiind prezența a 8 tipuri de cromozomi markeri. În tumori, cromozomul marker M8 era prezent într-o singură

Scanned with OKEN Scanner

copie; în culturi au apărut şi celule care prezentau doi cromozomi de tip M8. Prin clonări au fost obţinute populaţii omogene cu 1 şi respectiv 2 cromozomi M8. Cînd celulele cu 2 cromozomi M8 au fost injectate la animale, au apărut noduli tumorali alcătuiţi exclusiv din celule cu un cromozom M8.

În acest studiu este exemplificată o situaţie în care un cromozom supresor (M8) este pereche cu un cromozom morfologic identic (M8), dar care singur nu are o influenţă directă asupra supresiei malignităţii. Deşi au fost făcute investigaţii minuţioase, nu a putut fi însă identificat un grup specific de cromozomi responsabil pentru expresia malignităţii.

c) Studiul detaliat, cu ajutorul unor tehnici de bandare, al unor tumori umane şi experimentale a demonstrat că prezenţa anomaliilor cromozomiale nu reprezintă o condiţie obligatorie pentru instalarea malignităţii. Astfel, unele leucemii acute (87) şi granulocitare cronice în faza de acutizare (88), precum şi o parte din tumorile experimentale (88, 93, 101) pot prezenta cariotipuri normale.

15.7.2. Supresarea malignităţii prin fuziune celulară

Experienţele de hibridare celulară expuse în capitolul 12 au demonstrat că malignitatea unor celule tumorale de origini diferite este supresată în urma fuziunii cu celule nemaligne. Pe baza acestor cercetări s-a conchis că malignitatea este rezultatul unor deleţii genetice sau al unor mutaţii genice recesive. Supresia malignităţii în urma fuziunii cu un partener normal ar fi datorită capacităţii acestuia de a complementa defectul (47, 138).

Există însă lucrări care arată că ipoteza supresiei malignităţii prin fuziune celulară nu poate fi acceptată fără rezerve. Croce şi Koprowski (29–31) au hibridat celule de şoarece cu celule umane transformate cu virus SV40 şi au constatat că expresia antigenului tumoral T SV40 şi a antigenului tumoral specific de transplantare (TSTA) este condiţionată de prezenţa cromozomului uman nr. 7. Pentru a vedea dacă cromozomul uman nr. 7, care conţine genomul SV40, poartă şi

Scanned with OKEN Scanner

genele responsabile de transformarea malignă, au fost hibridate macrofage din peritoneul şoarecilor cu celule transformate cu SV40. Unele clone hibride izolate conţineau un genom complet de şoarece, peste care se suprapunea cromozomul uman nr. 7 (31). Întrucît aceste clone prezentau trăsăturile caracteristice ale celulelor transformate pierderea inhibaţiei de contact, densitate înaltă de saturaţie) s-a concluzionat că celulele normale de şoarece nu conţin gene capabile să supreseze expresia fenotipului transformat. În plus, hibrizii între macrofage peritoneale de şoarece şi celulele umane transformate cu SV40 produc tumori la şoarecii nuzi (28). Întrucît în celulele tumorigene era prezentă o garnitură completă de cromozomi de şoarece, rezultă că celulele normale de şoarece nu conţin gene capabile să supreseze expresia fenotipului tumorigen (27).

Aceste rezultate contravin ipotezei lui Harris şi Klein (47) şi Rabinowitz şi Sachs (118) asupra existenţei unor loci supresori ai expresiei malignităţii şi sugerează că diferiţi agenţi cancerigeni pot antrena mecanisme deosebite de control genetic a fenotipului transformat (31).

15.7.3. Relaţia dintre natura modificărilor cromozomiale şi agentul etiologic

Cercetările efectuate de Levan şi colab. (66–68) au demonstrat că tumorile induse de agenţi cancerigeni diferiţi prezintă aspecte cariologice distincte, chiar dacă tabloul histopatologic este identic. Această situaţie este exemplificată de tumorile induse cu virusul sarcomului Rous şi cu dimetilbenzantracen (DMBA) la şobolani (fig. 59). Modificările cromozomiale din tumorile induse de virusul

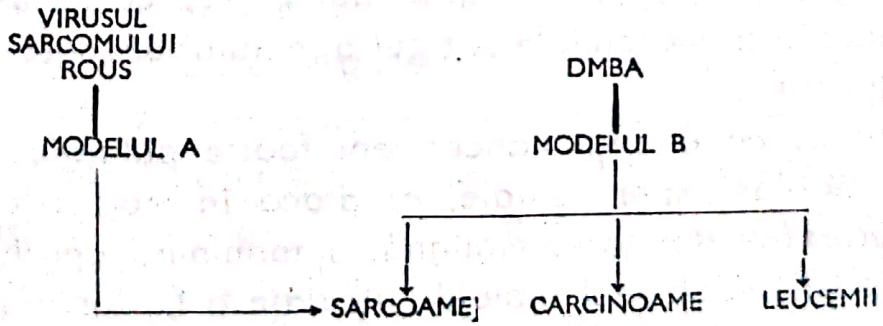
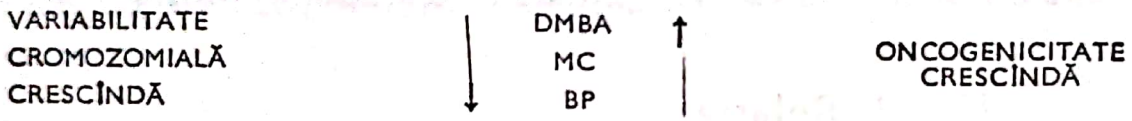


Fig. 59 — Modificările cromozomiale în decursul carcinogenezei cu virusul sarcomului Rous şi cu DMBA (modificat după Rowley, 122).

Scanned with OKEN Scanner

sarcomului Rous se conformează modelului A (apariția unui cromozom suplimentar telocentric de mărime mijlocie, urmată de apariția unor cromozomi suplimentari de tip st3 și st5). Sarcoamele induse cu DMBA (modelul B) se caracterizează prin trisomia cromozomului nr. 2. Întrucît aceeași anomalie a fost observată și în carcinoamele și în leucemiile induse cu DMBA la șobolani (90), s-a conchis că specificitatea tisulară nu ar influența constituția citogenetică a neoplaziilor (67). Deși materialul tumoral uman studiat pînă în prezent cu ajutorul tehnicilor de bandare este extrem de limitat, afectarea preferențială a anumitor cromozomi (nr. 8, 9, 14, 17, 20–22) este evidentă (86).

În sarcoamele induse cu metilcolantren (MC) sau cu benzpiren (BP) există o variație numerică considerabilă a cromozomilor normali, iar varietatea cromozomilor markeri este mult mai mare decît în cazul sarcoamelor induse cu DMBA. Levan (67) a sugerat că variabilitatea crescîndă a modificărilor cromozomiale ar constitui reversul capacității oncogene descrescînde a acestor compuși (DMBA > MC > BP):



Recent, Philip și colab. (110) au arătat însă că în mononucleoza infecțioasă, o afecțiune cauzată, ca și limfomul Burkitt, de virusul Epstein-Barr, lipsește markerul 14q+, caracteristic limfomului Burkitt. Această observație nu corespunde ipotezei lui Levan, conform căreia fiecare agent oncogen ar induce modificări cromozomiale specifice, indiferent de tipul de celulă afectată. Observațiile noastre asupra celulelor de hamster transformate cu virus SA7 (114) și a celulelor de șobolan transformate cu DMBA (101) au evidențiat existența unui spectru relativ larg de modificări cromozomiale, ceea ce arată că relația dintre modificările cromozomiale și tipul agentului oncogen nu este întotdeauna directă.

S-a presupus că agenții cancerigeni foarte puternici, utilizați în inducerea tumorilor experimentale, ar ataca în mod selectiv genele care controlează transformarea malignă, determinînd apariția unor tumori diploide (67). Genomul diploid nu pare a fi însă un „cărăuș" ideal al malignității și, chiar în aceste tumori, apar curînd modificări cromozomiale. Majoritatea tumorilor spontane ale omului și animalelor

Scanned with OKEN Scanner

prezintă însă restructurări cariotipice profunde. Modul ordonat în care se instalează aceste anomalii, precum şi relaţiile existente între tabloul cromozomial şi comportamentul tumorilor, fac improbabilă ipoteza ca ele să reprezinte modificări secundare, lipsite de importanţă. Conform *teoriei integrative a originii cromozomiale a cancerului* (46), aberaţiile cromozomiale ar reprezenta calea comună prin care agenţii cancerigeni induc malignitatea. Aceşti agenţi cancerigeni pot fi externi sau interni. Factorii externi includ virusurile oncogene, substanţele chimice cancerigene şi radiaţiile ionizante, a căror capacitate de a produce modificări cromozomiale este în prezent bine documentată.

Rolul factorilor interni este mai puţin studiat. Este totuşi clar că sindroamele genetice caracterizate printr-o fragilitate cromozomială crescută (anemia Fanconi, sindromul Bloom, ataxia-teleangiectazia), precum şi unele afecţiuni deteminate de anomalii ale cromozomilor somatici (trisomia 21, trisomia 18) sau sexuali (sindromul Klinefelter, sindromul Turner, sindromul de feminizare testiculară) reprezintă factori favorizanţi pentru apariţia cancerelor şi leucemiilor. Alţi factori interni răspunzători de apariţia unor aberaţii cromozomiale ar fi reprezentaţi de îmbătrînire şi de procesele de proliferare celulară intensă (46).

Rezultatul acţiunii acestor agenţi este reprezentat de apariţia unor celule mutante. Spectrul anomaliilor cromozomiale este determinat atît de natura agentului oncogen, care lasă o amprentă particulară asupra materialului genetic al celulei, cît şi de tipul de celulă implicată în interacţiune. Majoritatea acestor celule mutante sînt, probabil, eliminate datorită aparatului de supraveghere imunologică. Alte celule, dotate cu un avantaj proliferativ, dau naştere unor clone. Progresiunea acestor clone este guvernată atît de legile interne ale evoluţiei clonale, cît şi de presiunile selective exercitate continuu de organism (46). Variantele celulare cele mai bine adaptate vor prolifera şi vor da naştere tumorilor. Celulele dotate cu capacităţi metastazante deosebite vor constitui populaţia caracteristică metastazelor. În sfîrşit, variantele celulare rezistente la chimioterapie sau imunoterapie reprezintă cauza principală a eşecurilor noastre teapeutice.

Scanned with OKEN Scanner

La începutul acestei cărți afirmam că problema fundamentală a citogeneticii tumorale constă în elucidarea rolului modificărilor cromozomiale observate în celulele canceroase: intervin ele în etiologia cancerului sau sînt simple epifenomene? Citogeneticianul are sentimentul că „anomaliile cromozomiale nu par a fi nici cauza, nici consecința cancerului; ele sînt procesul neoplazic însuși" (63).

BIBLIOGRAFIE

1. ANDREESCU M., DOBRE V., MALTEZEANU G., MATEESCU C. — *Neoplasma*, 1970, *17*, 475.
2. ATKIN N. B. — *Europ. J. Cancer*, 1967, *3*, 289.
3. ATKIN N. B. — *Acta cytol.*, 1969, *13*, 270.
4. ATKIN N. B. — *Obstet. gynec. Surv.*, 1969, *24*, 794.
5. ATKIN N. B. — în: Genetic Concepts and Neoplasia, Ed. Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1970, p. 36.
6. ATKIN N. B. — *Cancer*, 1971, *27*, 1 064.
7. ATKIN N. B. — *Brit. med. J.*, 1972, *i*, 271.
8. ATKIN N. B. — în: Chromosomes and cancer (sub. red. J. German), Ed. J. Wiley and Sons, New York-Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 375.
9. ATKIN N. B., BAKER M. C., WILSON S. — *Amer. J. Obstet, Gynec.*, 1967, *99*, 506.
10. ATKIN N. B., BAKER M. C. — *Brit. J. Cancer*, 1969, *23*, 329.
11. ATKIN N. B., BAKER M. C. — *Lancet*, 1970, *i*, 470.
12. ATKIN N. B., BAKER M. C., ROBINSON R., GAZE S. E. — *Europ. J. Cancer*, 1974, *10*, 143.
13. ATKIN N. B., BRANDAO H. J. D. — *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth.*, 1968, *75*, 211.
14. ATKIN N. B., RICHARDS B. M. — *Brit. J. Cancer*, 1956, *10*, 769.
15. BAKER M. C. — citat de 5.
16. BENDER M. A., KASTENBAUM M. A., LEVER C. S. — *Brit. J. Cancer*, 1972, *26*, 34.
17. BENEDICT W. F., RUCKER N., MARK C., KOURI R. E. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1975, *54*, 157.
18. BEUTLER E., COLLINS Z., IRWIN L. E. — *New Engl. J. Med.*, 1967, *276*, 389.
19. BLOCH-SHTACHER N., RABINOWITZ Z., SACHS L. — *Int. J. Cancer*, 1972, *9*, 632.
20. BRANDAO H. J. S. — *Acta cytol.*, 1969, *13*, 232.
21. BRANDAO H. J. S., ATKIN N. B. — *Brit. J. Cancer*, 1968, *22*, 184.
22. CHIRICUȚĂ I., OLINICI C. D. — *Vorp. Onkol.*, 1972, *18*, 3, 60.
23. CHIRICUȚĂ I., OLINICI C. D. — *Morphol. Embryol.*, 1975, *21*, 97.
24. CHU E. W., MALMGREN R. A. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1961, *27*, 217.
25. CODISH S. D., PAUL B. — *Nature*, 1974, *252*, 610.
26. COELHO C. P., PFITZER P. — *Arch. Geschwulstforsch.*, 1974, *43*, 217.
27. CROCE C. M., ADEN D., KOPROWSKI H. — *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1975, *72*, 1 397.

Scanned with OKEN Scanner

28. CROCE C. M., GIRARDI A. J., KOPROWSKI H. — *Proc. Nat. Acad. Sci (Wash.)*, 1973, *70*, 3 617.
29. CROCE C. M., HUEBNER K., GIRARDI A. J., KOPROWSKI H. — *Virology*, 1974, *60*, 276.
30. CROCE C. M., KOPROWSKI H. — *J. exp. Med.*, 1973, *139*, 1 350.
31. CROCE C. M., KOPROWSKI H. — *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1975, *72*, 1 658.
32. DICULESCU G. — în: Cercetări de Genetică, Ed. didactică și pedagogică, București, 1969, vol. II, 535.
33. DOFUKU R., BIEDLER J. L., SPENGLER B. A., OLD L. J. — *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1975, *72*, 1 515.
34. EHLERS G. — *Hautarzt*, 1972, *23*, 480.
35. ENGEL E., MC KEEL. C., FLEXNER J. M., MC GEE B. J. — *Ann. Génét.*, 1975, *18*, 56.
36. FIALKOW P. J. — în: Genetic concepts and neoplasia, Ed. Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1970, p. 112.
37. FIALKOW P. J. — *Adv. Cancer Res.*, 1972, *15*, 191.
38. FIALKOW P. J., GARTLER S. M., YOSHIDA A. — *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1967, *58*, 1 468.
39. FIALKOW P. J., KLEIN G., GARTLER S. M., CLIFFORD P. — *Lancet*, 1970, *i*, 384.
40. FIALKOW P. J., SAGEBIEL R. W., CARTLER S. M., RIMOIN D. L. — *New Engl. J. Med.*, 1971, *284*, 298.
41. FORD C. E., HAMERTON J. L., MOLE R. H. — Comunicare la Symposium on Genetic Approaches to Somatic Cell Variation, Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, 1958, în volum, p. 235.
42. FRACCARO M., MANNINI A., TIEPOLO L. și colab. — *Lancet*, 1968, *i*, 613.
43. GARTIER S. M. — în: Chromosomes and cancer (sub red. J. German), Ed. J. Wiley and Sons, New York-Londra-Toronto, 1974, p. 313.
44. GARTLER S. M., ZIPRKOWSKY L., KRAKOWSKI A. și colab. — *Amer. J. hum. Genet.*, 1966, *18*, 282.
45. GEORGIAN L., MORARU I., LENGHEL Z. — *Lancet*, 1974, *i*, 208.
46. DE GROUCHY J., TURLEAU C. — în: Chromosomes and cancer (sub red. J. German), Ed. J. Wiley and Sons, New York-Londra-Syndey-Toronto, 1974, p. 287.
47. HARRIS H., MILLER O. J., KLEIN G. și colab. — *Nature (Lond.)*, 1969, *223*, 363.
48. HASHMI S., ALLDERDICE P. W., KLEIN G., MILLER O. J. — *Cancer Res.*, 1974, *34*, 79.
49. HITOTSUMACHI S., RABINOWITZ Z., SACHS L. — *Nature (Lond.)*, 1971, *231*, 511.
50. HITOTSUMACHI S., RABINOWITZ Z., SACHS L. — *Int. J. Cancer*, 1972, *9*, 305.
51. HITOTSUMACHI S., SCHAKI R., PADEH B. și colab. — *Int. J. Cancer*, 1972, *10*, 9.
52. HSU T. C., BILLEN D., LEVAN A. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1961, *27*, 515.
53. INUI N. — *Gann*, 1963, *54*, 331.
54. INUI N. — *Jap. J. Genet.*, 1964, *41*, 115.
55. ISAKA H., IZUMITANI M., UMEHARA S., SATO M., SATO H. — *Gann*, 1967, *58*, 167.
56. ISHIHARA T., KIKUCHI Y., SANDBERG A. A. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1963, *30*, 1 303.
57. IZUO M., OKAGAKI T., RICHART R. M., LATTES R. — *Cancer*, 1971, *28*, 620.
58. KAZIWARA K. — *Cancer Res.*, 1954, *14*, 795.

Scanned with OKEN Scanner

59. KISELEVA N. S., SOCOVA O. I., PLATONOVA G. M., POGOSIANZ H. E. — *Vopr. Onkol.*, 1964, *10*, 11, 61.
60. KNUDSON A. G., STRONG L. C. — *Amer. J. hum. Genet.*, 1972, *24*, 514.
61. KROGH JENSEN M. — *Acta med. scand.*, 1970, *181*, 571.
62. LEJEUNE J. — *Rev. Prat. (Paris)*, 1963, *13*, 21.
63. LEJEUNE J. — în: Les chromosomes humains (sub red. R. Turpin, J. Lejeune), Ed. Gauthier Villars, Paris, 1965, p. 181.
64. LEJEUNE J. — Comunicare la al IX-lea Congres Internațional în problema cancerului, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, UICC Monograph Series, vol. 9, 1967, p. 71.
65. LEJEUNE J., BERGER R., RETHORÉ M.-O. — C. R. *Acad. Sci. (Paris)*, 1966, *263*, 1 880.
66. LEVAN A. — *Hereditas*, 1966, *55*, 28.
67. LEVAN G. — Cytogenetic studies in experimental rat sarcomas, Teză de doctorat, Universitatea din Lund, 1975.
68. LEVAN G., AHLSTRÖM U., MITELMAN F. — *Hereditas*, 1974, *77*, 263.
69. LINDER D. — *Proc. Nat. Acad. Sci (Wash.)*, 1969, *63*, 699.
70. LINDER D., GARTLER S. M. — *Science*, 1965, *150*, 67.
71. MAEDA M., TABATA T., KUSUYAMA S., KIMURA T. — *Wakayama Med. Rep.*, 1964, *8*, 85.
72. MAEDA M., TABATA T., SAITO H. — *Wakayama Med. Rep.*, 1965, *9*, 225.
73. MAKINO S. A. — *Chromosoma*, 1952, *4*, 649.
74. MAKINO S. — în: Chromosomes and cancer (sub red. J. German), Ed. John Wiley and Sons, New York-Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 335.
75. MAKINO S., SASAKI M. S., TONOMURA A. — *J. Nat. Cancer Inst.* 1964, *32*, 741.
76. MANOLOV G., MANOLOVA Y. — *Nature (Lond.)*, 1972, *237*, 33.
77. MARK J. — în: Chromosomes and Cancer (sub red. J. German), Ed. John Wiley and Sons, New York-Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 497.
78. MARK J., MITELMAN F., DENCKER H. și colab. — *Acta path. microbiol. scand.*, 1973, *81 A*, 85.
79. MARTINEAU M. — *Lancet*, 1966, *i*, 839.
80. MEEK E. S. — *J. Path. Bact.*, 1961, *82*, 167.
81. MILES C. P. — *Brit. J. Cancer*, 1974, *30*, 73.
82. MILES C. P., WOLINSKA W. — *Cancer*, 1973, *32*, 1 458.
83. MINKLER J. L., GOFMAN J. W., TANDY R. K. — *Brit. J. Cancer*, 1970, *24*, 726.
84. MITELMAN F. — *Hereditas*, 1972, *70*, 1.
85. MITELMAN F. — în: Chromosomes and cancer (sub red. J. German), Ed. J. Wiley and Sons, New York-Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 675.
86. MITELMAN F. — *Hereditas*, 1975, *81*, 294.
87. MITELMAN F., BRANDT L. — *Scand. J. Haemat.*, 1974, *13*, 321.
88. MITELMAN F., LEVAN G., BRANDT L. — *Hereditas*, 1975, *80*, 291.
89. MITELMAN F., MARK J. — *Hereditas*, 1970, *65*, 227.
90. MITELMAN F., MARK J., LEVAN G., LEVAN A. — *Science*, 1972, *176*, 1 340.
91. MONDAL S., EMBLETON M. J., MARQUARDT H., HEIDELBERGER C. — *Int. J. Cancer*, 1971, *8*, 410.

Scanned with OKEN Scanner

92. MORARU I., DICULESCU G. L. — Studiul citogenetic clasic al imunoproliferărilor maligne umane (IMU), comunicare la a II-a Conferință de biologie celulară, București, 1976.
93. MORI M., SASAKI M. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1974, *52*, 153.
94. MULDAL S., ELEJALDE R., HARVEY P. W. — *Nature (Lond.)*, 1971, *229*, 48.
95. NICHOLSON S. F., THURSTON O. G., BOWEN P. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1968, *41*, 217.
96. NOMURA S., FISCHINGER P. J., MATTERN C. F. T. și colab. — *Virology*, 1972, *50*. 51.
97. NOWELL P. C. — în: Chromosomes and cancer (sub red. J. German), Ed. J. Wiley and Sons, New York-Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 267.
98. OLINICI C. D. — *Acta haemat.*, 1972, *48*, 283.
99. OLINICI C. D. — *Cytologia (Tokyo)*, 1973, *38*, 271.
100. OLINICI C. D., CRIȘAN M. — *Viața med. (Buc.)*, 1969, *16*, 191.
101. OLINICI C. D., DI PAOLO J. A. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1974, *52*, 1 627.
102. OLINICI C. D., DOBAY O., ALMAȘAN M. — *Neoplasma*, 1976, *15*, 7.
103. OLINICI C. D., EVANS C. H., DI PAOLO J. A. — *J. Cell Physiol.*, 1973, *83*, 401.
104. OLINICI C. D., GALATAR N., LAZAROV P., GIURGIUMAN M. — *Neoplasma*, 1973, *20*, 311.
105. OLINICI C. D., GIURGIUMAN M., GALATAR N., MÂRZA V. — *Arch. Geschwulst forsch.*, 1976, *46*, 129.
106. OLINICI C. D., RISCA R. — *Oncologia (Buc.)*, 1975, *14*, 289.
107. OLINICI C. D., SIMU G. — *Neoplasma*, 1970, *17*, 663.
108. OXFORD J. M., HARNDEN D. G., PARRINGTON J. M., DELHANTY J. D. A. — *J. Med. Genet.*, 1975, *12*, 251.
109. PARK I., JONES H. W. — *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 1968, *102*, 106.
110. PHILIP P., ERNST P., LANGE WANTZIN G. — *Scand. J. Haemat.*, 1975, *15*. 201.
111. POLLACK R. E., GREEN H., TODARO G. J. — *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1968, *60*, 126.
112. POLLACK R., VOGEL A. — *J. Cell Physiol.*, 1973, *82*, 93.
113. POLLACK R., WOLMAN S., VOGEL A. — *Nature (Lond.)*, 1970, *228*, 938.
114. POPESCU N. C., OLINICI C. D., CASTO B. C., DI PAOLO J.A. — *Int. J. Cancer*, 1974, *14*, 461.
115. PREDA V., OLINICI C. D. — *Morfol. norm. și pat.*, 1973, *18*, 17.
116. RABINOWITZ Z., SACHS L. — *Nature (Lond.)*, 1968, *220*, 1 203.
117. RABINOWITZ Z., SACHS L. — *Virology*, 1970, *40*, 193.
118. RABINOWITZ Z., SACHS L. — *Nature (Lond.)*, 1970, *225*, 136.
119. RABINOWITZ Z., SACHS L. — *Int, J. Cancer*, 1972, *9*, 334.
120. RABOTTI G. — *Nature (Lond.)*, 1959, *183*, 1 276.
121. REEVES B. R. — *Humangenetik*, 1973, *20*, 231.
122. ROWLEY J. D. — *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1975, *72*, 152.
123. SACHS H., SCHITTKO G. — *Arch. Gynäk.*, 1975, *218*, 95.
124. SANDBERG A. A. — *Cancer Res.*, 1966, *26*, 2 064.
125. SANDBERG A. A., BROSS I. D. J., TAKAGI N., SCHMIDT M. L. — *Cancer*, 1968, *21*, 77.

Scanned with OKEN Scanner

126. SHANI M., RABINOWITZ Z., SACHS L. — *J. Virol.*, 1972, *10*, 456.
127. SHATS V. I. — *Vopr. Onkol.*, 1968, *14*, 1, 89.
128. SILAGI S., BRUCE S. A. — *Proc. Nat. Acad. Sci (Wash.)*, 1970, *66*, 72.
129. SILAGI S., NEWCOMB E. W., WEKSLER M. E. — *Cancer Res.*, 1974, *34*, 100.
130. SLOT E. — *Neoplasma*, 1967, *14*, 3.
131. SMITH J. W., TOWNSEND D. E., SPARKES R. S. — *Clin. Genet.*, 1971, *2*, 160.
132. SOKAL G., MICHAUX J. L., VAN DEN BERGHE H. și colab. — *Blood*, 1975, *46*, 519.
133. SPIERS A. S. D., BAIKIE A. G. — *Brit. J. Cancer*, 1970, *24*, 77.
134. SPRIGGS A. I. — în Chromosomes and cancer (sub red. J. German), Ed. J. Wiley and Sons, New York-Londra-Sydney-Toronto, 1974, p. 423.
135. STEENIS H. VAN — *Nature (Lond.)*, 1966, *209*, 819.
136. TOWNSEND D. E., SPARKES R. S., BALUDA M. C., Mc CLELLAND G. — *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 1970, *107*. 1 168.
137. VENDRELY C., RIVIÉRE M. R., GUÉRIN M. — *Bull. Cancer*, 1962, *49*, 35.
138. WIENER F., KLEIN G., HARRIS H. — *J. Cell Sci.*, 1974, *15*, 177.
139. WURSTER-HILL D. H., MC INTYRE O. R., CORNWELL G. G., MAURER L. H. — *Lancet*, 1973, *ii*, 1 031.
140. YAMAMOTO T., HAYASHI M., RABINOWITZ Z., SACHS L. — *Int. J. Cancer*, 1973, *11*, 555.
141. YAMAMOTO T., RABINOWITZ Z., SACHS L. — *Nature New Biol.*, 1973, *243*, 247.
142. YOSIDA T. H. — *Gann*, 1961, *52*, 313.

Scanned with OKEN Scanner

REDACTOR: Dr. MARIANA BERBECARU
TEHNOREDACTOR: N. PANAITIDE

COLI TIPAR: 16,25
TIRAJ: 6980 ex. (6800+80 S.P.+100 PT. EXPOZIȚII)
BUN DE TIPAR LA 22 XI 1978

TIPARUL EXECUTAT LA I. P. SIBIU
ȘOS. ALBA IULIA Nr. 40

Scanned with OKEN Scanner